



DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Participación de la proteína CarS  
en la regulación de la carotenogénesis  
y el estrés  
en *Fusarium fujikuroi***

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Farmacia por la  
licenciada

Macarena Ruger Herreros

Sevilla, 2016

Director

Directora

Doctorando

Dr. Francisco Javier  
Ávalos Cordero

Dra. María del Carmen  
Limón Mirón

Macarena Ruger Herreros



A mi familia,





## INDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	
1. <i>Fusarium spp</i>	3
2. Metabolismo secundario	5
2.1. Policétidos	5
2.1.1. Bicaaverinas	6
2.1.2. Fusarinas	6
2.2. Terpenoides	7
2.2.1. Giberelinas	7
2.2.2. Carotenoides	8
3. Síntesis de carotenoides en hongos	8
3.1. Regulación de la carotenogénesis en <i>F. fujikuroi</i>	10
3.2. El fenotipo carS	12
3.2.1. Dominio RF (RING finger)	15
3.2.2. Dominio proteasa LON	17
4. Fotoreceptores	17
4.1. White collar	18
4. 2. VIVID	21
4. 3. Criptocromos y fotoliasas	22
4. 4. Fitocromos	25
4. 5. Rodopsinas	26
5. Regulación por nitrógeno	28
5.1. Asimilación de nitrato	31
6. Regulación por estrés	33
6.1. Estrés térmico	34
6.1. Estrés oxidativo	35
6.2.1. Catalasas	37
6.2.2. Otras enzimas detoxificantes	39
Superóxido dismutasa (SOD)	39
Glutation peroxidasa (GPxs) y peroxirredoxinas	39
Glutation S-transferasa (GST)	40
Tioredoxinas	41
7. Métodos de secuenciación masiva: RNA-seq	42
II. OBJETIVOS	47
III. CAPÍTULO 1. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA CarS	51
1.1. Producción de proteína de fusión GST-CarS	51
1.2. Ensayos de unión a ADN (EMSA)	53
1.3. Localización subcelular de CarS	57
1.4. Búsqueda de interacciones mediante la técnica del doble híbrido	58
1.4.1. Obtención de estirpes para el doble híbrido y controles previos	61
1.4.2. Análisis de una posible interacción entre CarS y WcoA	63
1.5. Escrutinio de proteínas capaces de interaccionar con CarS	65

1.5.1. Construcción de la genoteca para el ensayo del doble híbrido	65
1.5.2. Conjugación y escrutinio de diploides	66
1.5.3. Caracterización de los plásmidos derivados de pGADT7 en los clones positivos	67
1.5.4. Comprobación de la interacción entre los clones obtenidos y la proteína CarS	68
1.6. Identidad de los candidatos positivos	69
1.7. Expresión de los genes candidatos	72
 IV. CAPÍTULO 2. EFECTO DE LA MUTACIÓN carS Y DE LA LUZ SOBRE EL TRANSCRIPTOMA DE <i>F.fujikuroi</i>	 77
2.1. Diseño experimental	77
2.2. Control de la calidad de las muestras de ARN	79
2.3. Secuenciación	80
2.4. Análisis de la expresión génica	82
2.5. Análisis del transcrito del gen carS	83
2.6. Análisis de la expresión génica diferencial	86
2.7. Restauración del fenotipo silvestre en la estirpe complementante SG256	89
2.8. Relación entre los efectos de la luz y de la mutación carS	91
2.9. Identidad de los genes	93
2.10. Categorías funcionales GO de los genes activados por la luz y por la mutación del gen carS	97
2.11. Genes de estrés fuertemente influidos por la luz y la mutación carS	100
 V. CAPÍTULO 3: RELACIÓN DE LA CAROTENOGÉNESIS Y EL GEN carS CON LA REGULACIÓN POR LUZ Y ESTRÉS	 105
3.1. Regulación por luz	105
3.1.1. Efecto de la luz en cultivos líquidos en agitación	105
3.1.2. Efecto de la iluminación en cultivos líquidos estáticos	108
3.2. Regulación por nitrógeno	111
3.3. Regulación por choque térmico	113
3.4. Regulación por estrés oxidativo producido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	116
3.4.1. Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre el crecimiento de <i>F.fujikuroi</i>	117
3.4.2. Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la carotenogénesis de <i>F.fujikuroi</i>	120
3.5. Regulación de genes con dominios catalasa por luz y por CarS	123
3.5.1. Genes con dominios catalasa en el genoma de <i>F.fujikuroi</i>	123
3.5.2. Influencia de la luz y la mutación carS en la expresión de los genes con dominios catalasa de <i>F.fujikuroi</i>	124
3.5.3. Influencia del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la expresión de los genes de <i>F.fujikuroi</i> con dominios catalasa	127
 VI. DISCUSIÓN	 131
1. La proteína CarS	131
2. Posibles dianas regulatorias de CarS	133
3. Impacto de la ausencia de CarS en el transcriptoma y relación con la luz	137

4. Relación de CarS con las condiciones de estrés	141
VII. CONCLUSIONES	147
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	151
1. Estirpes	151
2. Plásmidos	152
2.1. Vectores de clonación	152
2.2. Plásmidos construidos	153
3. Medios y condiciones de cultivo	154
3.1. Medios y condiciones de cultivo para <i>F.fujikuroi</i>	154
3.2. Medios y condiciones de cultivo para <i>E.coli</i>	154
3.3. Medios y condiciones de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	155
3.3. Recogida de esporas y mantenimiento de estirpes	155
4. Ensayo de germinación	155
5. Extracción de ácidos nucleicos	156
5.1. Extracción de ácidos nucleicos	156
5.2. Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos	156
6. Manipulación y tratamientos de ácidos nucleicos	156
6.1. Tratamiento con ADNasa	156
6.2. Síntesis de ADNc	157
6.3. Tratamiento con enzimas de restricción	157
6.4. Desfosforilación de extremos de ADN	157
6.5. Ligación	157
6.6. Electroforesis de ácidos nucleicos	158
6.7. Secuenciación de ADN	158
7. RT-PCR a tiempo real	158
8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	160
8.1. Enzimas y condiciones	160
8.2. Purificación de productos de PCR	161
9. Transformación de <i>E.coli</i>	161
9.1. Transformación clásica	161
9.2. Transformación por electroporación	162
9.3. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	163
10. Extracción de ADN plasmídico	163
10.1. Extracción de plásmidos de <i>E.coli</i>	163
10.2. Extracción de plásmidos de <i>S.cerevisiae</i>	164
11. Extracción de proteínas totales	164
11.1. Extracción de proteínas totales de <i>E.coli</i>	164
11.2. Extractos totales de proteínas de <i>E.coli</i> por sonicación	165
11.3. Extractos de proteínas totales de <i>Fusarium</i>	165
12. Purificación de proteínas de fusión	165
12.1. Optimización de las condiciones de inducción	165
12.2. Obtención de extractos crudos de proteínas de <i>E.coli</i>	166
12.3. Purificación de la proteína GST-CarS expresada en <i>E.coli</i>	166
12.4. Cuantificación de proteínas	166
12.5. Precipitación de proteínas	167

13. Electroforesis de proteínas	167
13.1. Tinción con azul de Coomassie	168
14. Análisis de proteínas mediante western	168
14.1. Transferencia de proteínas amembranas de nitrocelulosa	168
14.2. Tinción de membranas de nitrocelulosa	168
14.3. Inmunodetección	168
15. Ensayos de retardo en gel	169
16. Fraccionamiento celular	170
17. Escrutinio de interacción con CarS mediante el sistema del doble híbrido	170
17.1. Genoteca: construcción y conjugación	170
17.2. Aislamiento de plásmidos derivados de pGADT7	171
18. Extracción y análisis de carotenoides	172
19. Bioinformática	172
19.1. Análisis de estructura y dominios	172
19.2. Tratamiento de datos de RNA-seq	173
 IX. BIBLIOGRAFÍA	 179
 X. Anexos	 209
Anexo 1.A. Genes activados por luz en la estirpe silvestre	209
Anexo 1.B. Genes reprimidos por luz en la estirpe silvestre	221
Anexo 1.C. Genes activados por carS en la oscuridad	230
Anexo 1.D. Genes reprimidos por carS en oscuridad	243
Anexo2.1: Categorías funcionales asignadas a los genes inducidos por luz	258
Anexo2.2: Categorías funcionales asignadas a los genes inducidos por la La mutación <i>carS</i>	260

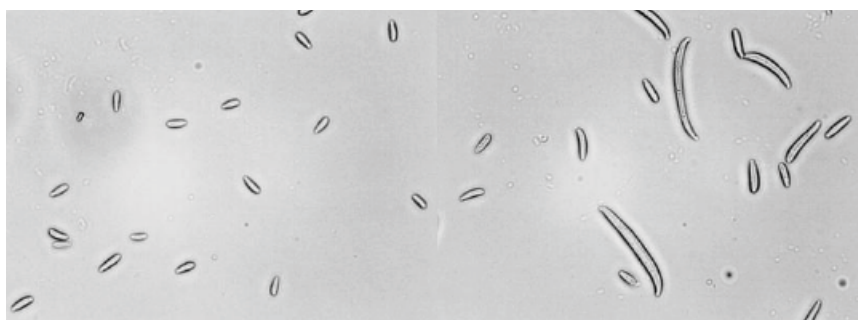
## **I.INTRODUCCION**



## I.INTRODUCCIÓN

### 1. *Fusarium spp*

El género *Fusarium*, pertenecientes a la clase de los Ascomicetos, engloba un grupo muy extenso de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en la naturaleza, presentes en el suelo o asociados a plantas. Su nombre tiene su origen en la morfología de los conidios, los cuales pueden ser microconidios fusiformes y uninucleados (Avalos et al., 1985) o macroconidios, mucho mayores, arqueados, tabicados y presuntamente multinucleados (Kuhlman et al., 1983).



**Figura I1. Microconidios y macroconidios de *Fusarium***

La mayoría de las especies de *Fusarium* son fitopatógenas, están presentes en gran variedad de ecosistemas, y causan importantes pérdidas económicas en la agricultura. Concretamente, la especie *F. fujikuroi* es patógena de *Oryza sativa* (arroz), infectando sus cultivos y produciendo la enfermedad conocida como “bakanae” por los agricultores japoneses (Hori et al., 1898). La infección se produce a partir de esporas presentes en el suelo o en el agua de riego, y las plantas infectadas desarrollan tallos inusualmente altos, delgados y quebradizos, una alteración muy característica atribuida a la acción de hormonas inductoras del crecimiento (giberelinas) excretadas por el hongo (Tudzynski, B., 2005). En las fases más avanzadas de la infección, las plantas enfermas producen granos de arroz anormales, y presentan síntomas de marchitez, generando importantes pérdidas económicas en las plantaciones afectadas. Otra especie del mismo género, *Fusarium oxysporum*, es responsable de un rango mucho más amplio de enfermedades vasculares de plantas. La mayoría de las cepas infectan de forma específica a una especie vegetal concreta, dando lugar a su

clasificación en variedades conocidas como *formae speciales* (f. sp.). Así, las cepas de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* atacan preferentemente la planta de algodón, y las de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* la planta del tomate (Leslie y Summerell, 2006). Aunque son principalmente patógenos de plantas, las especies del género *Fusarium* han sido descritas también como patógenos oportunistas en la especie humana, con consecuencias importantes en personas inmunodeprimidas (Austwick et al., 1984).

Grupo de cruzamiento	Especie de <i>Fusarium</i>
<b>A</b>	<i>Verticillioides</i>
<b>B</b>	<i>Sacchari</i>
<b>C</b>	<i>Fujikuroi</i>
<b>D</b>	<i>Proliferatum</i>
<b>E</b>	<i>Subglutinans</i>
<b>F</b>	<i>Thapsinum</i>
<b>G</b>	<i>Nygamai</i>
<b>H</b>	<i>Circinatum</i>
<b>I</b>	<i>Konzum</i>
<b>J</b>	<i>Gaditjirrii</i>
<b>K</b>	<i>Xylarioides</i>

**Tabla I1: Redenominaciones como especies de *Fusarium* de los grupos de cruzamiento del complejo *Gibberella fujikuroi*.**

Antiguamente, *Fusarium fujikuroi* se denominaba *Gibberella fujikuroi*, pero estudios posteriores mostraron que bajo este nombre se agrupaban distintas especies, puestas en evidencia por su compatibilidad sexual. Así, dicha especie empezó a conocerse como “complejo *Gibberella fujikuroi*”, que actualmente comprende 11 grupos de cruzamiento (Tabla 1), cada uno correspondiente a una especie haploide heterotática diferente de *Fusarium* (O’Donnell et al., 1998, Britz et al., 1999, Zeller et al., 2003, Phan et al., 2004, Lepoint et al., 2005)



## 2. Metabolismo secundario

Una de las características más llamativas de las especies de *Fusarium* es su capacidad para producir una amplia variedad de metabolitos secundarios, generalmente pertenecientes a las familias de los policétidos o de los terpenoides. Los compuestos resultantes del metabolismo secundario no son esenciales para el desarrollo del hongo, y su producción suele estar sujeta a condiciones ambientales o etapas del desarrollo muy concretas (Calvo et al., 2002). En el caso de *Fusarium fujikuroi*, se ha prestado especial atención a diferentes policétidos, entre los que cabe destacar las bicaverina y las fusarinas, y a dos terpenoides, los carotenoides y las giberelinas. Estos dos últimos tienen considerable interés biotecnológico. En el caso de los carotenoides, son pigmentos con propiedades beneficiosas para la salud, extensamente empleados como aditivos alimentarios, y para su producción industrial se usan algunos hongos (Avalos et al., 2004). Por su parte, las giberelinas son hormonas vegetales producidas por las plantas en concentraciones muy pequeñas, y que regulan diferentes procesos de su desarrollo, como la elongación del tallo, la inducción de las enzimas hidrolíticas durante la germinación, la estimulación de la floración o la formación del fruto (Yamaguchi et al., 2008). Las propiedades estimuladoras del crecimiento de las giberelinas les confiere numerosas aplicaciones en agricultura (Rademacher et al., 1992), dando lugar su adición a las plantas a aumentos en los rendimientos de los cultivos. Su obtención industrial se basa fundamentalmente en el empleo de cultivos de *F. fujikuroi*.

Otros metabolitos secundarios son micotoxinas, y los perjuicios potenciales para la salud derivados de su presencia en plantas infectadas destinadas a consumo humano justifican su estudio. Entre ellas cabe destacar los tricotecenos, las fumonisinas, las zearalenonas, las fusarinas, el ácido fusárico y la bicaverina, entre otras (Desjardins et al., 2007; Avalos et al., 2007; Limón et al., 2010).

### 2.1. Policétidos

Los policétidos constituyen una familia de metabolitos secundarios estructuralmente muy diversos. Su síntesis tiene lugar a partir de acetil-CoA por medio de un complejo multienzimático conocido como sintetasa de policétidos (PKS, de “polyketide synthase”), cuyas reacciones tienen similitud con las llevadas a cabo

por un complejo similar en la síntesis de ácidos grasos (Hopwood et al., 1997). El nexo común entre la actividad de ambos complejos enzimáticos es la condensación de dos moléculas de acetil-CoA en el inicio de la ruta y la posterior elongación por adición de moléculas de malonil-CoA. En los últimos años se ha prestado especial atención a las bases genética y molecular de las síntesis de dos policétidos producidos por *F. fujikuroi*, las bicaverina y las fusarinas.

### 2.1.1 Bicaverinas

La bicaverina es un pigmento de color rojo que posee actividad antibiótica frente a protozoos (Balan et al., 1970). En *F. fujikuroi*, la producción de este pigmento es estimulada por la ausencia de nitrógeno y sales del medio (Linnemannstöns et al., 2002; Rodríguez-Ortiz et al., 2010), el pH ácido (Giordano et al., 1999) o la presencia de sacarosa como fuente de carbono (Rodríguez-Ortiz et al., 2010). Además del producto final, la bicaverina, se detecta en los cultivos un precursor también pigmentado, la norbicaverina. Los genes responsables de su síntesis están organizados en un *cluster* de 6 genes *bik*, donde *bik1* determina una PKS específica y está co-regulado con otros dos genes estructurales de la ruta, *bik2* y *bik3* y con un gen de una permeasa, *bik6*, siendo los dos genes restantes reguladores. La expresión del *cluster* de los genes *bik* es controlada por una compleja red de proteínas reguladoras, algunas de ellas implicadas también en la producción de otros metabolitos (Wiemann et al., 2009).

### 2.1.2 Fusarinas

Las fusarinas son micotoxinas de leve pigmentación amarillenta, aunque su máximo de absorción lo presentan en el UV cercano. Su síntesis es mayor en condiciones de temperatura elevada, dentro del margen tolerado por el hongo (Barrero et al., 1991). Su toxicidad se debe a que tienen propiedades mutagénicas, constituyendo por tanto su presencia en alimentos contaminados por *Fusarium* una amenaza para la salud (Avalos et al., 2007). El gen *fusA* (Díaz-Sánchez et al., 2012), también llamado *fus1* (Niehaus et al., 1013), codifica la PKS específica de su biosíntesis y se agrupa en un *cluster* con otros ocho genes. La producción de fusarina guarda relación directa con los niveles de expresión del gen *fusA/fus1* y otros genes del

*cluster*, indicando la existencia de una co-regulación transcripcional (Díaz-Sánchez et al., 2012, Niehaus et al., 2013)

## 2.2. Terpenoides

Como los policétidos, Los terpenoides constituyen una extensa familia de compuestos químicamente muy diversos. Todos los terpenoides comparten la síntesis a partir de un precursor hidrocarbonado de cinco átomos de carbono, el isopentenil pirofosfato (IPP). Además de metabolitos secundarios como los carotenoides y las giberelinas, los terpenoides incluyen compuestos esenciales para la vida, como los esteroides, necesarios para conservar la integridad de las membranas celulares, o los dolicoles, cadenas poliinsaturadas con diversas funciones.

### 2.2.1 Giberelinas

Aparte de las plantas, donde su presencia es generalizada, las giberelinas son sintetizadas por muy pocos microorganismos, entre los que destaca *F. fujikuroi* por su enorme capacidad de producción. Las giberelinas se identificaron por primera vez en los medios de cultivo de este hongo cuando era conocido como *Gibberella fujikuroi*, lo que explica el nombre de estas hormonas. Debido a su interés biotecnológico, los mecanismos moleculares que controlan la síntesis de giberelinas en *F. fujikuroi* han recibido considerable atención. La producción de giberelinas es favorecida por condiciones limitantes de nitrógeno, y su producción tiene lugar sólo en las fases estacionarias de cultivo, una vez ha desaparecido el nitrógeno del medio (Candau et al., 1992). Como es frecuente para la síntesis de metabolitos secundarios, los genes de la ruta están organizados en un *cluster* coregulado, formado en este caso por siete genes, de los cuales ninguno cumple funciones regulatorias (Tudzynski, 2005). En la regulación juega un papel destacado AreA (Tudzynski et al., 1999), un regulador global de la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno en hongos del que se habla también en la sección 5, pero participan también muchas otras proteínas, con frecuencia implicadas también en la regulación de otras rutas metabólicas (Tudzynski, 2014).

### 2.2.2 Carotenoides

Los carotenoides son moléculas lineales hidrocarbonadas de longitud variable, con dobles enlaces conjugados y que pueden presentar anillos cerrados en los extremos de la cadena. Según las sustituciones que presentan, se clasifican en carotenos (formados sólo por carbono e hidrógeno) o xantofilas (contienen además oxígeno). Los dobles enlaces conjugados les confiere la capacidad de absorber luz visible y es responsable del color característico de cada uno de ellos, habitualmente en el rango del rojo al amarillo. El color de cada carotenoide depende tanto del número de dobles enlaces conjugados presentes en la molécula como de la presencia de anillos.

Los carotenoides son pigmentos vitales en plantas y algas por su papel como fotorreceptores y transmisores de energía a los centros de reacción fotosintéticos (Edge et al., 1997). En humanos se obtienen por la dieta, y desempeñan diferentes papeles en el funcionamiento correcto del organismo (Maiani et al., 2009). El más importante es el  $\beta$ -caroteno, antioxidante y precursor de retinal, esencial para el desarrollo de la retina y cuya carencia produce ceguera, y el ácido retinoico, un morfógeno esencial en el desarrollo de los cordados. Las propiedades antioxidantes de los carotenoides contribuyen a la mejora de la respuesta inmunológica (Jyonouci et al., 1993) y, en general, su presencia en la dieta confiere numerosos efectos positivos sobre la salud (Mares-Perlman et al., 2002; Giovannucci, 2002). Los carotenoides tienen importantes aplicaciones biotecnológicas, son ampliamente usados en cosmética y alimentación, figurando los hongos entre los organismos usados para su producción industrial (Ávalos y Cerdá-Olmedo, 2004).

### 3. Síntesis de carotenoides en hongos

La capacidad de sintetizar carotenoides es un carácter frecuente en los hongos. En algunos de ellos, como *Neurospora crassa*, *Phycomyces blakesleeana*, *Mucor circinelloides* y *Fusarium fujikuroi*, tanto la enzimología de las rutas como su regulación han sido objetos de estudio especialmente detallado (Sandmann y Misawa, 2002; Avalos et al. 2014). La comparación de sus rutas biosintéticas muestra que son similares en los primeros pasos, y que se diversifican en pasos posteriores, para dar en algunos casos carotenos y en otros xantofilas. El IPP se sintetiza a partir de ácido

mevalónico, vía acetil-CoA. Aunque se ha descrito una ruta alternativa a partir de valina y leucina en algunos organismos (Goodwin et al., 1980), en los hongos investigados la síntesis tiene lugar por la vía del mevalonato, que se convierte en IPP mediante dos fosforilaciones y una descarboxilación. El IPP se condensa con un isómero de sí mismo, el dimetilalil pirofosfato (DMAPP), para dar lugar al geranil pirofosfato (GPP), de diez átomos de carbono. Dos nuevas reacciones de condensación dan lugar al farnesil pirofosfato (FPP, de 15 átomos de carbono) y al geranilgeranil pirofosfato (GGPP, de 20 átomos de carbono). A continuación, dos moléculas de GGPP se condensan para dar el fitoeno, la primera molécula de 40 átomos de carbono con la típica estructura de los carotenos. Sin embargo, la ausencia de dobles enlaces conjugados hace que este precursor sea aún incoloro. En *F. fujikuroi*, tras cinco reacciones de desaturación para introducir dichos dobles enlaces, una ciclación, una rotura oxidativa y una nueva oxidación, se obtienen uno de los productos finales de la ruta: la neurosporaxantina, un apocarotenoide de 35 átomos de carbono y un grupo carboxilo en su extremo. Una bifurcación de esta ruta implica una segunda ciclación, para dar lugar a  $\beta$ -caroteno.

De las primeras reacciones, se encargan dos enzimas. La primera es la enzima bifuncional fitoeno sintasa/caroteno ciclasa, denominada CarRA, que sintetiza el fitoeno a partir de GGPP y que lleva a cabo las ciclaciones en los extremos (Linnemannstöns et al., 2002). La segunda enzima, CarB, es la desaturasa que genera los dobles enlaces conjugados. Para la síntesis de neurosporaxantina intervienen además una oxigenasa (CarT), responsable de la rotura oxidativa del toruleno en  $\beta$ -apo-carotenal (Prado-Cabrero et al., 2007), y una aldehído deshidrogenasa (CarD), que oxida el grupo aldehído del  $\beta$ -apo-carotenal para generar el grupo carboxilo de la neurosporaxantina (Díaz-Sánchez et al., 2011). La introducción de la segunda ciclación para producir  $\beta$ -caroteno tiene lugar a nivel de -caroteno. El  $\beta$ -caroteno es a su vez sustrato de una segunda oxidasa, CarX, que lo corta por la mitad para producir dos moléculas de retinal (Prado-Cabrero et al., 2007).

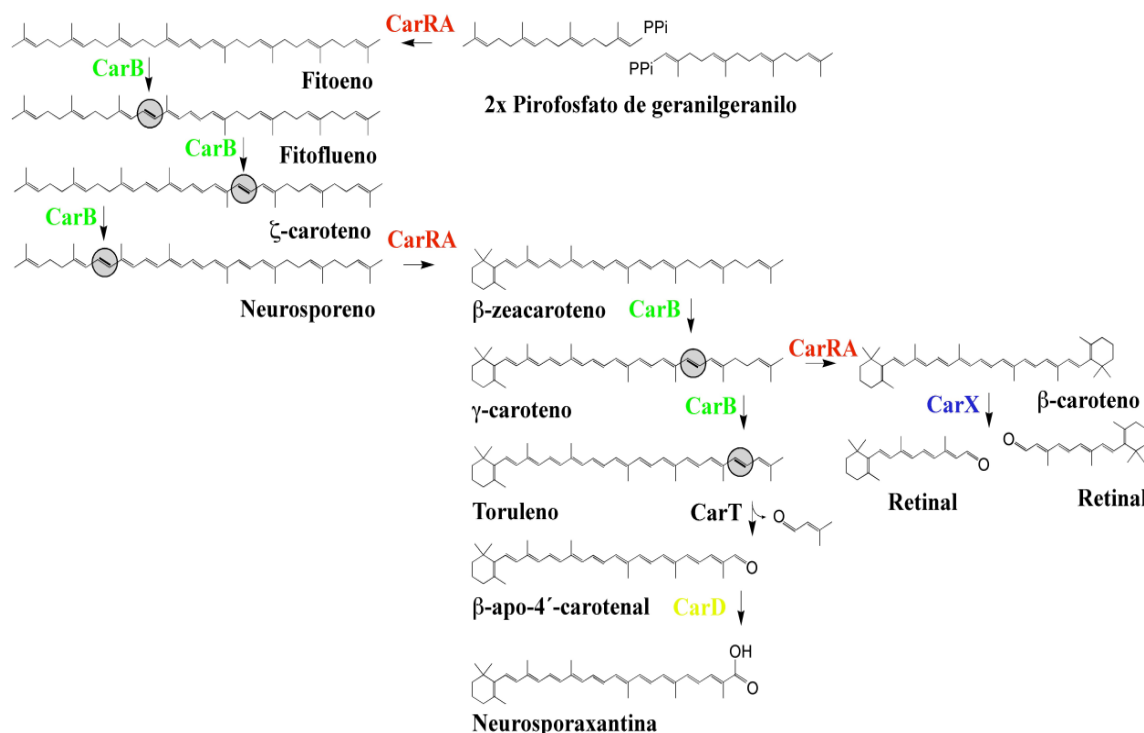


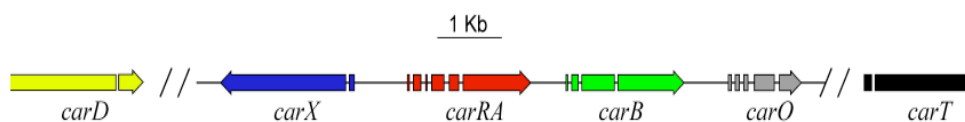
Figura I2. Ruta de la carotenogénesis en *F. fujikuroi*.

### 3.1 Regulación de la carotenogénesis en *F. fujikuroi*

La biosíntesis de carotenoides es regulada por luz en un gran número de organismos, incluyendo hongos filamentosos como *P. blakesleeanus*, *M. circinelloides*, *Blakeslea trispora*, *F. fujikuroi* y *N. crassa* (Bejarano et al. 1991, Navarro et al. 1995, Velayos et al. 1997, Quiles-Rosillo et al., 2005; Avalos et al., 1987, Bramley et al., 1992). Dicha activación en *P. blakesleeanus* y *N. crassa* y el fototropismo de los cuerpos fructíferos de *P. blakesleeanus* se han utilizado como modelos de respuestas a la luz azul en hongos (Cerdá-Olmedo et al., 2001, Corrochano et al., 2010, Linden et al., 1997, Chen et al., 2010). Además de la luz, la síntesis de carotenoides en hongos puede estar regulada por otros factores, como la interacción sexual entre estirpes de sexo opuesto, o la presencia de ciertos agentes químicos (Avalos et al., 1992). Los genes estructurales que codifican para las enzimas implicadas en la carotenogénesis han sido clonados y caracterizados en *N. crassa* (Schmidhauser et al. 1990, 1994; Carattoli et al. 1991; Linden et al. 1997), *M. circinelloides* (Velayos et al. 2000a, 2000b), *B. trispora* (Rodríguez-Sáiz et al., 2004), *P. blakesleeanus* (Ruíz-Hidalgo et al.

1997; Arrach et al. 2001) y *F. fujikuroi* (Fernández-Martín et al., 2000; Linnemannstöns et al., 2002, Prado-Cabrero et al., 2007, Díaz-Sánchez et al., 2011).

La disponibilidad de los genes ha facilitado los estudios de su regulación a nivel de transcripción. El primer gen identificado para una enzima de la carotenogénesis en *Fusarium* fue *carB* (Fernández-Martín et al., 2000), al que siguieron por su proximidad en el genoma *carRA* (Linnemannstöns et al., 2002) y *carX* (Thewes et al., 2005). Los genes necesarios para sintetizar  $\beta$ -caroteno y retinal, *carRA*, *carB*, *carX* y están estrechamente ligados formando un *cluster* con el gen de una de las dos rodopsinas de *Fusarium*, *carO*, mientras que *carT* y *carD* se encuentran en otros lugares del genoma (Figura I3). Recientemente se ha observado que la rodopsina CarO, de forma similar a la bacteriorodopsina de arqueas, es una bomba de protones que usa la luz como fuente de energía (García-Martínez et al., 2015).

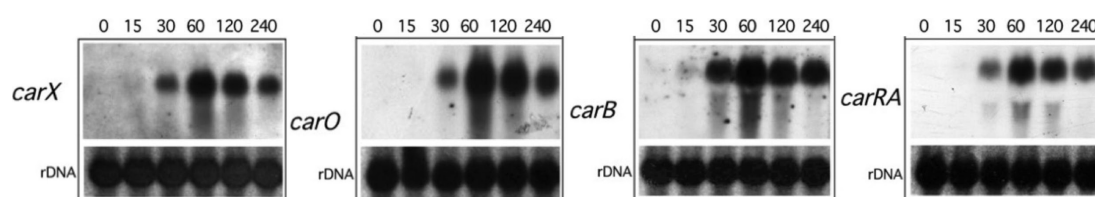


**Figura I3. Organización genómica de los genes implicados en la carotenogénesis en *F. fujikuroi*.**

La carotenogénesis en *F. fujikuroi* es estimulada por la luz, la cual da lugar a la adquisición de una pigmentación anaranjada debido a la acumulación de neurosporaxantina y sus precursores (Avalos y Cerdá Olmedo, 1987; Avalos y Schrott, 1990). Una respuesta similar se ha observado en otras especies de *Fusarium*, como *F. verticillioides* (Adám et al., 2011) o *F. oxysporum* (Rodríguez-Ortiz et al. 2012). En la regulación por luz juega un papel importante el control a nivel de transcripción (Avalos y Estrada, 2010). En condiciones de oscuridad, los niveles de ARN mensajero de los genes del cluster *car*, que incluyen *carRA* y *carB*, son bajos, pero aumentan rápidamente al iluminar el micelio hasta alcanzar su valor máximo aproximadamente una hora después (Prado et al., 2004, Thewes et al., 2005, Prado-Cabrero et al. 2007). En otros hongos, como *N. crassa*, la respuesta transcripcional de los genes ortólogos, en este caso *al-1* y *al-2*, es muy similar, y es mediada esencialmente por las proteínas del complejo White Collar (Corrochano y Avalos, 2010). Sin embargo, los mutantes del gen White Collar *wcoA* de *F. fujikuroi* siguen mostrando fotoinducción de la carotenogénesis (Estrada y Avalos, 2008), indicando la participación de otros

fotorreceptores. Recientemente se han caracterizado en *F. fujikuroi* los genes de otros dos fotorreceptores, *vvdA* (Castrillo y Avalos, 2014), ortólogo del gen *vvd* de *N. crassa* (Corrochano y Avalos, 2010) y *cryD* que cifra un criptocromo de tipo DASH. Un reciente estudio ha mostrado que los tres fotorreceptores participan en el proceso de fotoinducción, en el que WcoA es el inductor principal a nivel de transcripción y en el que CryD desempeña un papel en la iluminación a más largo plazo, explicando la existencia de fotoinducción en los mutantes *wcoA* (Castrillo y Avalos, 2015). Por su parte, el gen *vvd* participa también en la regulación, presumiblemente modulando la actividad de WcoA y VvdA por mecanismos aún no esclarecidos. El papel de los fotorreceptores en la regulación por luz en hongos se describe en más detalle en la sección 4.

Además de la luz, la carotenogénesis es regulada en *F. fujikuroi* por nitrógeno, como indica la inducción de la expresión de los genes *car* y de la síntesis de carotenoides que se observa cuando el hongo se transfiere en la oscuridad a un medio carente de nitrógeno (Rodríguez-Ortiz et al., 2009). Por otra parte, en *F. fujikuroi* se obtienen con facilidad mutantes con un fenotipo intensamente anaranjado, y que acumulan gran cantidad de carotenoides independientemente de la presencia de la luz. El fenotipo desregulado de estos mutantes pone en evidencia la existencia de una proteína represora de la carotenogénesis, cuyas funciones y mecanismo de acción constituyen uno de los objetos de estudio principales en esta Tesis.



**Figura I4. Efecto de la luz sobre los niveles de ARN mensajero en distintos genes *car* de *F. fujikuroi*** (modificado de Avalos y Estrada, 2010).

### 3.2 El fenotipo *carS*

Los mutantes *carS* deben su denominación a su cualidad de sobreproducir carotenoides bajo cualquier condición de cultivo, siendo el compuesto mayoritario la



neurosporaxantina (Avalos et al., 1987). El fenotipo *carS* se describió en *Fusarium* por primera vez hace casi 30 años (Avalos et al., 1987), pero sólo recientemente se conoce el gen cuya mutación causa este fenotipo (Rodríguez-Ortiz, 2012).



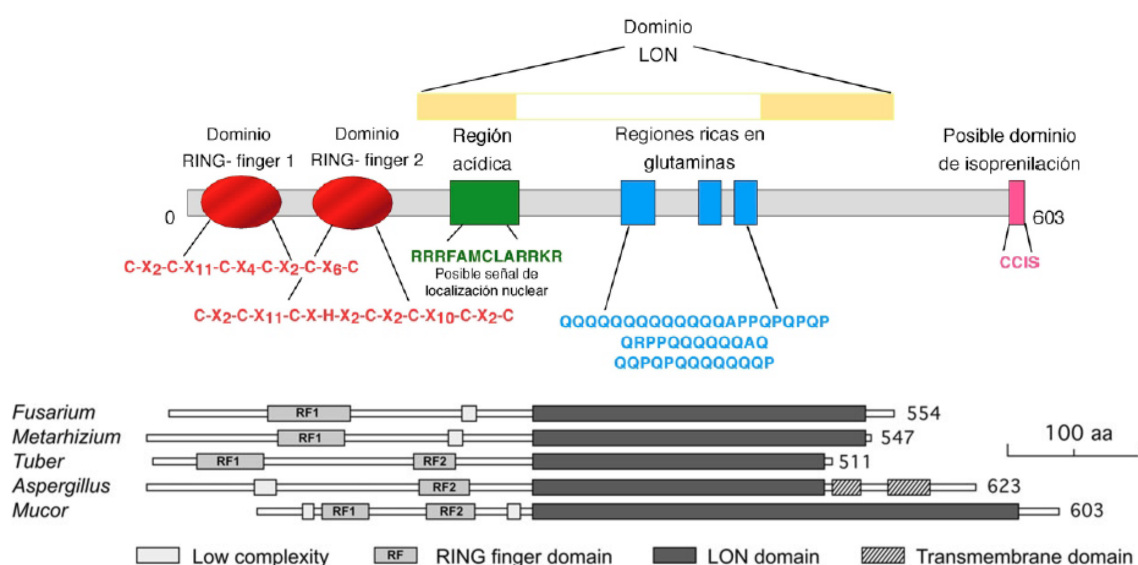
**Figura I5. Aspecto del fenotipo de los mutantes *carS* de *F. fujikuroi* en la oscuridad.**

A la izquierda colonias en agar de la estirpe silvestre (A) y un mutante *carS* (B). A la izquierda cultivos en medio líquido de las mismas estirpes incubadas durante un tiempo similar en agitación.

Los mutantes *carS* de *F. fujikuroi* son pleiotrópicos, ya que muestran también alteraciones en la regulación de la síntesis de giberelinas y bikaverinas (Rodríguez-Ortiz et al., 2009). El gen *carS* se identificó gracias al análisis molecular de mutantes *carS* en una colección de mutantes insercionales de *F. oxysporum*, obtenida por el grupo de C. Michielse y M. Rep en la Universidad de Amsterdam (Michielse et al., 2005). Aunque ninguna de las inserciones afectó al propio ORF del gen, la alteración de secuencias próximas a *carS* en dos mutantes de fenotipo superproductor de carotenoides, y el fenotipo parecido mostrado por los mutantes de un gen homólogo en *M. circinelloides* (Navarro et al., 2000) llevó a sospechar de la participación de este gen en *F. oxysporum*, donde se han descrito también mutantes similares (Rodríguez-Ortiz et al. 2012). La identidad del gen se confirmó mediante la identificación de alelos mutantes en distintas estirpes *carS*, la complementación de una de ellas por introducción del alelo silvestre, y la obtención dirigida de un mutante con una delección. A raíz de estos resultados, experimentos similares han permitido confirmar la identidad del gen *carS* en *F. fujikuroi* y que el alelo silvestre de esta especie es capaz de reemplazar funcionalmente, al menos de forma parcial, al gen mutado en *F. oxysporum* (Rodríguez-Ortiz, 2013).

De acuerdo con su secuencia, CarS pertenece la familia RING-finger, un tipo de proteínas reguladoras ya estudiadas en otros organismos. Como ya se ha mencionado,

ciertos mutantes desregulados en la carotenogénesis de *M. circinelloides* (Navarro et al., 2001) están afectados en una proteína de la misma familia, llamada CrgA (de “carotenoids regulatory gene”), habiéndose descrito posteriormente también en *B. trispora* (Quiles-Rosillo et al., 2005). La proteína CrgA actúa como regulador negativo de la fotocarotenogénesis en *M. circinelloides*. Su identificación, debida a la inactivación del gen por duplicación de un fragmento en un transformante con una genoteca destinada a otro fin (Navarro et al., 2000), constituyó un hito especialmente en su campo, ya que se trata del primer gen regulador específico de la carotenogénesis identificado en hongos. De forma análoga a los mutantes *carS* de *Fusarium*, la mutación dirigida de *crgA* en *M. circinelloides* produce una sobreacumulación de  $\beta$ -caroteno, tanto bajo condiciones de luz como de oscuridad, como consecuencia de un fuerte incremento en la expresión de los genes estructurales de la ruta (Navarro et al., 2001; Lorca-Pascual et al., 2004).



**Figura I6. Esquema de la proteína CrgA y proteínas homólogas en otros hongos** (Basado en Navarro et al., 2001 y Murcia-Flores et al., 2007). Arriba: dominios estructurales en CrgA. Aguas abajo de sus dominios RING finger (abreviado como RF en adelante), se detectan dos regiones acídicas y un dominio LON interrumpido por tres regiones ricas en prolina y glutaminas. A continuación posee una señal de localización nuclear bipartita (Navarro et al., 2000) y en el extremo C-terminal contiene una secuencia CCIS, que podría ser diana de isoprenilación (Navarro et al., 2000). Abajo: Comparación de la proteína CrgA con la proteína CarS y otras proteínas homólogas en hongos.

Aunque originalmente, debido a una anotación errónea de un intrón en los genomas de *Fusarium* disponibles en las bases de datos, se asignó un solo dominio RF

a esta proteína (Fig. I6), análisis transcriptómicos descritos en esta tesis permiten identificar un segundo dominio RF en el extremo N-terminal, siendo por tanto similar en este aspecto a CrgA. Respecto al resto de los dominios de CrgA, la proteína CarS posee un dominio LON, aunque menos interrumpido, y no posee segmentos largos de poliglutamina, los cuales son necesarios para la función de CrgA (Lorca-Pascual et al. 2004). También carece del dominio de señalización nuclear bipartita, aunque no parece que este sea indispensable para la función represora en CrgA. Además sólo hay dos regiones ricas en glutamina en vez de tres, que son mucho más cortas y no interrumpen el dominio LON.

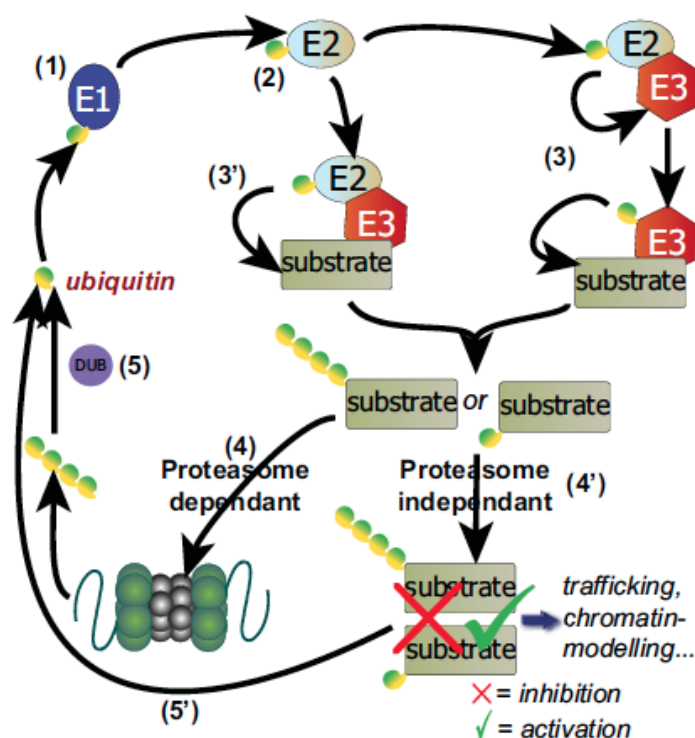
Los niveles de proteína CrgA son muy bajos en *M. circinelloides*, por lo que se le atribuye una baja estabilidad. Bajo iluminación se detectan cantidades constantes y cuatro veces superiores a las detectadas en la oscuridad (Lorca-Pascual et al., 2004; Navarro et al., 2001). El gen *crgA* tiene un codón de inicio de la traducción no convencional (GUG), que podría ser otra causa de los bajos niveles de la proteína, ya que el inicio de la traducción de genes con codones que no sean AUG es menos eficiente y da lugar a niveles muy bajos de proteína (Kozak et al., 1989). Sin embargo, la sustitución del triplete GUG por AUG no tiene como consecuencia un aumento en los niveles de la proteína (Murcia-Flores et al., 2007), sugiriendo la existencia de otros mecanismos que mantienen la proteína a niveles bajos.

Los mutantes *crgA* están afectados en otros aspectos de la biología del hongo, como la formación de hifas aéreas y la esporulación. Estas alteraciones no se deben a la sobreacumulación de  $\beta$ -caroteno, ya que mutantes *crgA* albinos, obtenidos por silenciamiento del gen *carB*, muestran el mismo fenotipo (Nicolas-Molina et al., 2003). Además de los genes carotenogénicos, *crgA* también reprime la expresión de *cigA*, un gen que se encuentra aguas abajo de *crgA*. El gen *cigA* está implicado en el crecimiento vegetativo y también se induce en condiciones de iluminación. El efecto de *crgA* sobre la expresión de *cigA* y la esporulación sugiere que *crgA* regula otros procesos celulares además de la carotenogénesis (Quiles-Rosillo et al., 2003).

### 3.2.1 Dominio RF (RING finger)

Los dominios RF canónicos contienen ocho residuos de cisteína o histidina que les permiten coordinar dos iones de zinc, creando un dominio globular que media la interacción entre proteínas (Lipkowitz et al., 2001). Muchas de las proteínas que

contienen un dominio RF actúan como ligasa de ubiquitina de tipo E3 y median la transferencia de la ubiquitina desde la E2 al sustrato. Las ligasas E3 unen ubiquitina a proteínas muy diversas. El sistema de degradación de proteínas marcadas con ubiquitina a través del proteosoma juega un papel crucial en la regulación del nivel de proteína, interviniendo en procesos celulares de gran relevancia. Entre ellos figuran el ciclo celular, la transducción de señales, la regulación de la transcripción así como el metabolismo y el control de calidad de las proteínas, degradando las mal sintetizadas u oxidadas (Schapira et al., 1990; Schubert et al., 2000). Los dominios RF son característicos de la familia de ligasas de ubiquitina E3, que marcan a las proteínas para su regulación (Fang et al. 2003).



**Figura I8. Representación de la vía de degradación mediada por ubiquitinación** (Ponts et al., 2008)

Los dominios RF de CrgA son necesarios para su función (Lorca-Pascual et al., 2004, Murcia-Flores et al., 2007), ya que mutaciones puntuales en residuos esenciales en cualquiera de sus dos dominios RF provocan la pérdida de su función en la carotenogénesis. Puesto que las ligasas E3 normalmente actúan marcando proteínas para su degradación por el proteosoma, la presencia de dominios RF en CrgA llevaron a proponer que podría ejercer su función represora marcando activadores transcripcionales para su degradación por el proteosoma (Murcia-Flores et al., 2007).

De hecho, el dominio RF en CrgA es necesario para inactivar a MCWC-1b ubiquitinándola (Silva et al. 2008). Existen sin embargo otras alternativas; en ocasiones, la adición de ubiquitinas puede actuar impidiendo la formación de multímeros en proteínas que forman parte de complejos o inhibir o activar modificaciones post-traduccionales, tras la modificación en ciertos residuos (Topisirovic et al., 2009).

### 3.2.2. Dominio proteasa LON

El dominio LON se encuentra en el extremo N-terminal de las proteasas dependientes de ATP de la familia LON (Rawlings et al., 1994). Participan en respuestas a estrés y en la defensa frente a daños en el ADN. Intervienen en la transcripción y replicación de ADN mitocondrial, actuando sobre las proteínas que necesitan ser degradadas (Liu et al., 2004, Lu et al., 2007). Los datos disponibles sugieren que el dominio LON es importante en la interacción con las proteínas diana (Rotanova et al., 2004), aunque también es capaz de interaccionar con ADN bicatenario en bacterias, y con ADN monocatenario y ARN en eucariotas (Liu et al., 2004; Lu et al., 2007). El dominio LON de CrgA es esencial para su función en la carotenogénesis (Lorca-Pascual et al., 2004; Murcia-Flores et al., 2007). Por su naturaleza, dicho dominio podría permitir la unión de proteínas reguladoras a los promotores, donde los marcaría con ubiquitina, pudiendo actuar además como superficie de interacción. La búsqueda de proteínas que se unan a los promotores *car* es objeto de estudio actualmente en el grupo de investigación donde se ha desarrollado esta Tesis.

## 4. Fotorreceptores

Los fotorreceptores son proteínas capaces de detectar la luz gracias a su unión a un cromóforo como grupo prostético (Herrera-Estrella et al., 2007). Existen distintos tipos de fotorreceptores en función del tipo de cromóforo, que a su vez determina el tipo de longitud de onda que son capaces de absorber. Así, Los fotorreceptores pueden clasificarse según el tipo de luz que detectan: roja, azul o verde. Los cromóforos conocidos son de tres tipos: retinal, tetrapirroles y flavinas.

Además de intervenir en el desarrollo de los hongos, la luz azul actúa como señal ambiental activando rutas metabólicas, como la síntesis de carotenoides, o dirigiendo el desarrollo de estructuras reproductoras. La mayoría de respuestas a la luz en hongos se deben a la detección de luz azul, aunque también se conocen respuestas a otras longitudes de onda. Así, por ejemplo, la conidiación es regulada por luz roja en *Aspergillus nidulans* (Mooney et al., 1990) por ultravioleta cercano en *Alternaria tomato* (Kumagai, 1989). Se ha prestado menos atención a las fotorrespuestas a luz verde, aunque se ha observado que ésta afecta a la producción de esporas en los patógenos de plantas *Tricometasphaeria turcica* y *Alternaria solani* (Klein, 1992).

#### 4.1. White collar

Como ya se indicó en la sección 3.1, la regulación por luz de la carotenogénesis en *N. crassa* es mediada por el complejo White collar (WC) (Harding et al., 1981), formado por las proteínas WC-1 y WC-2. El gen *wc-1* se identificó inicialmente gracias al estudio de mutantes carentes de fotoinducción de la carotenogénesis en este hongo (Degli-Innocenti et al., 1984). El fenotipo *white collar* de *N. crassa* se debe a una regulación diferente de la carotenogénesis en el micelio y las esporas. En el micelio la síntesis de carotenoides es dependiente de la luz, pero en los conidios se acumulan carotenoides tanto en luz como en oscuridad. Como consecuencia, en los cultivos en agar inclinado el mutante presenta la masa aérea pigmentada, mientras que en la base se aprecia un anillo albino, lo que dio origen a su nombre. Esta característica los hace fácilmente distinguibles de los mutantes albinos alterados en los genes estructurales de la ruta biosintética (*al-1*, *al-2* y *al-3*), en los que tanto la biomasa como los conidios son albinos. El análisis genético de los mutantes de fenotipo “white collar” mostró la existencia del segundo gen, denominado *wc-2*, cuya mutación produce el mismo fenotipo. El complejo WC centraliza todas las fotorrespuestas conocidas de *N. crassa*. Así, los mutantes *wc* también están también afectados en la regulación por luz de la conidiación, el ritmo circadiano o la orientación a la luz de los picos de sus peritecios (Ballario et al., 1996; Degli-Innocenti et al., 1984; Harding y Melles, 1983; Sargent y Briggs, 1967).

Las proteínas fotoreceptoras de tipo White Collar-1 tienen un dominio LOV, que es una variante de los dominio PAS (*Per-Arnt-Sim*) de interacción entre proteínas



(Taylor et al., 1999) y un dominio quinasa, necesario para la actividad del fotorreceptor (Briggs et al., 2007). Los fotorreceptores de tipo LOV regulan la mayoría de respuestas a la luz en hongos (Purschwitz et al., 2006), utilizando un cromóforo de tipo flavina (Van der Horst et al., 2004). En el interior del dominio LOV se localiza la flavina unida de forma no covalente mediante puentes de hidrogeno, enlaces de Van der Waals e interacciones electrostáticas. La excitación de la flavina por la luz produce un enlace covalente transitorio entre la flavina y una cisteína conservada del dominio LOV (Crosson et al., 2002; Kennis et al., 2004). La formación de este enlace modifica la estructura de la proteína permitiendo la actividad quinasa de la misma e iniciando así una cascada de señales en la respuesta a la luz. Este enlace se rompe lentamente en oscuridad, restaurando el estado inicial de la proteína.

Las proteínas de tipo White collar-2 carecen de dominio LOV, por lo que no pueden actuar por sí mismas como fotorreceptores, pero poseen los dominios PAS y el dedo de zinc. En *N. crassa*, estos complejos, junto a la proteína FRQ, forman parte del oscilador central del reloj circadiano (Cheng et al., 2002), mientras que VVD (Heintzen et al., 2001), la otra proteína de hongos con dominio LOV, es responsable de la fotoadaptación (ver sección 4.2).

Análisis posteriores en otros hongos han mostrado la presencia de proteínas de tipo WC-1 y WC-2 en numerosas especies. La amplia distribución de estos fotorreceptores en los hongos sugiere una aparición temprana en la evolución para regular las respuestas a la luz (Idnurm y Heitman, 2005, Idnurm et al., 2010). Existen homólogos en cigomicetos, como *M. circinelloides*, *P. blakesleeanus*, *Rhizopus oryzae* y *Pilobolus crystallinus* (Silva et al., 2006, Idnurm et al., 2006, Sanz et al., 2009; Kubo et al., 2009), en basidiomicetos, como *Cryptococcus neoformans* (Idnurm et al., 2005), *Lentinula edodes* (Sano et al., 2007; Sano et al., 2009) y *Coprinus cinereus* (Terashima et al., 2005) y en ascomicetos, como *Trichoderma reesei* (Castellanos et al., 2010), *Magnaporthe oryzae* (Lee et al., 2006), *A. nidulans* (Purschwitz et al., 2008), además de *Fusarium* (*F. oxysporum*, Ruíz-Roldán et al., 2008, y *F. fujikuroi*, Estrada y Ávalos, 2008, ya mencionado). Los ascomicetos poseen una sola copia de gen tipo *wc-1*, y en algunos casos ninguna (Idnurm et al., 2005). A diferencia de *N. crassa*, los mutantes en estos genes presentan fenotipos que los implican también en procesos no regulados por luz, como la inducción de la conidiación por falta de glucosa en *Trichoderma atroviride* (Casas-Flores et al., 2006).

En los cigomicetos analizados existen varias copias de los genes de tipo *wc* (Corrochano y Garre, 2010). Sus funciones han sido investigadas en bastante detalle en *M. circinelloides*, cuyo genoma contiene tres genes *wc-1*: *mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c*. El único cuya expresión está controlada por luz es *mcwc-1c*, y los otros dos se expresan de forma constitutiva tanto en luz como en oscuridad. Los dominios LOV de las tres proteínas Mcwc-1 conservan los aminoácidos conservados, necesarios para su función, y las tres poseen un lazo extendido de 11 aminoácidos respecto a los dominios LOV de plantas, entre las hélices A y C. Dicho lazo se al uso de FAD como cromóforo, en vez de FMN, como ocurre en las fototropinas de plantas (Casas-Flores et al., 2004; Cheng et al., 2003b, Crosson et al., 2003). El gen *mcwc-1c* es el elemento clave en la inducción de la carotenogénesis por la luz, ya que mutantes nulos de este gen presentan una reducción de la acumulación de  $\beta$ -caroteno en respuesta a la luz (Silva et al., 2006). La proteína Mcwc-1c regula la expresión de los genes carotenogénicos, activando su transcripción en presencia de luz, pero su ausencia se traduce solo en una pequeña bajada de los niveles de carotenos (Silva et al., 2006). Estas diferencias entre los niveles de ARNm de los genes carotenogénicos y la acumulación de carotenoides también se ha observado en otros hongos, como *N. crassa*, pero el mecanismo subyacente se desconoce (Merrow et al., 2001; Schwerdtfeger and Linden, 2001).

El gen *mcwc-1b* participa en un mecanismo regulador de la síntesis de caroteno independiente de la luz. En este mecanismo, la proteína CrgA reprime la síntesis de caroteno mediante la ubiquitilación de Mcwc-1b con dos moléculas de ubiquitina, lo que se traduce en el bloqueo de la función de Mcwc-1b, ya que la forma no ubiquitilada de esta proteína es capaz de activar la expresión de los genes carotenogénicos en oscuridad. Mcwc-1b es capaz de interaccionar consigo misma (Silva et al., 2008), siendo probable que forme complejos WCC constituidos por Mcwc-1b y alguna o varias de las proteínas Mcwc-2, de forma similar a lo que ocurre en *N. crassa* (Cheng et al., 2003a) y *P. blakesleeanus* (Sanz et al., 2009).

Como ya se ha mencionado anteriormente, los genomas de *Fusarium* contienen un gen ortólogo a *wc-1* de *N. crassa*, así como un ortólogo de *wc-2*. En *F. fujikuroi*, las características de *wcoA* lo diferencia en varios aspectos de *wc-1*. Así, mientras que la expresión de *wc-1* es inducible por luz, la de *wcoA* no parece mostrar cambios significativos (Estrada et al., 2008). Además, los mutantes *wcoA* de *F. fujikuroi* están



afectados en otros aspectos del metabolismo, como la producción de giberelinas, bikaverinas y fusarinas, o del desarrollo, como la conidiación o la hidrofobicidad de las hifas (Estrada et al., 2008). El mismo gen de *F. oxysporum*, denominado en este caso *wc1*, participa en el desarrollo de hifas aéreas, la patogenicidad en mamíferos, y la fotorreactivación dependiente de la luz UV (Ruiz-Roldán et al., 2008). WcoA es necesario para la fotoinducción completa de los genes de la síntesis de carotenoides, aunque en dicha regulación participan también al menos una proteína de la familia VIVID y un criptocromo (Castrillo y Avalos, 2015).

## 4.2 VIVID

VIVID (o VVD) es una proteína de *N. crassa* de pequeño tamaño, constituida por un dominio LOV y una extensión N-terminal de 70 aminoácidos (Ncap) implicada en su dimerización (Zoltowski et al., 2007, Zoltowski et al., 2008). VVD puede dimerizar de forma inestable y dependiente de la luz, consigo misma y con el complejo WC. En *N. crassa* esta proteína desempeña un papel clave en la fotoadaptación y en la sincronización del reloj circadiano. Tras la activación de la transcripción del gen *vvd* por la luz, la proteína VVD recién sintetizada reprime al complejo WC, compitiendo con éste mediante la formación de heterodímeros WCC-VVD, así como regulando su fosforilación de forma dependiente de FRH, una helicasa asociada a la función de la proteína FRQ (Hunt et al., 2010, Malzahn et al., 2010, Schafmeier et al., 2005). El mecanismo molecular del efecto de la luz sobre VVD es similar al de WC-1. Una cisteína de VVD forma una unión covalente con una flavina, lo que induce un cambio conformacional en el dominio N-terminal que parece ser esencial para la función represora (Chen et al., 2010; Schwerdtfeger and Linden, 2003).

En *T. reesei* se ha descrito la proteína ENVOY (Env1), ortóloga de VVD y compuesta también solo por un dominio LOV/PAS. ENVOY desempeña un papel más relevante que VVD, ya que su pérdida por mutación en *T. reesei* da lugar a un crecimiento pobre en la luz (Schmoll et al., 2005) mientras que el crecimiento de los mutantes *vvd* apenas se ve alterado. Además, Env1 interviene en la regulación de la producción de celulasas (Schmoll et al., 2004) y en la conidiación. Env1 tiene en común con VVD que sus mutantes presentan alteradas algunas respuestas dependientes de luz y mantienen activa la expresión de genes fotoinducibles más tiempo, lo que parece indicar que Env1 modula negativamente a Blr1 y Blr2, ortólogos

de Wc-1 y Wc-2 (Castellanos et al., 2010). A pesar de la similitud de secuencias entre ambas proteínas, y otras características regulatorias, Env1 no complementa la ausencia de vvd en *N. crassa*, lo que indica que los mecanismos de transmisión de la señal son diferentes en ambas especies.

En *F. fujikuroi* la mutación dirigida del gen ortólogo de vvd, *vvdA*, produce en la luz una pigmentación más pálida que en la estirpe silvestre debido a una menor acumulación de carotenoides, indicando la participación de VvdA en esta fotorrespuesta (Castrillo et al., 2014). Los mutantes muestran además otras alteraciones fenotípicas bajo iluminación, como una menor producción de conidios y un desarrollo diferente del micelio sobre agar. La menor acumulación de carotenoides en los mutantes del gen *vvdA* no es acompañada por cambios detectables en la fotoinducción de los niveles de ARNm de los genes de la carotenogénesis en medio líquido. Sin embargo, en medio sólido, los mutantes *vvdA* muestran un incremento más rápido en su contenido en carotenoides las primeras horas, cuando actúa WcoA, y más lenta en las horas siguientes, cuando actúa el criptocromo CryD, dando lugar finalmente al menor contenido en carotenoides (Castrillo y Avalos., 2015). La respuesta más rápida en las primeras horas es congruente con un efecto negativo de VvdA sobre el complejo WC de este hongo, similar a lo observado en *N. crassa* y *T. reesei*.

#### 4.3 Criptocromos y fotoliasas

En el espectro de luz visible, los fitocromos absorben las longitudes de onda en la región del rojo (Wang et al., 2002), mientras que los criptocromos y fototropinas detectan longitudes de onda en la región azul y ultravioleta-A del espectro (Lin et al., 2003). En las plantas, los criptocromos y fitocromos controlan las respuestas del crecimiento y el desarrollo a variaciones en la intensidad, longitud de onda y duración de la irradiación diurna (Cashmore et al., 1999; Smith, 2000), mientras que la función principal de las fototropinas es controlar la dirección del crecimiento en respuesta a la dirección e intensidad de la luz (Sakai et al., 2001).

Los criptocromos y las fotoliasas forman una familia de fotorreceptores que se diferencian principalmente en su actividad reparadora de daños en el ADN, presentes en las fotoliasas (Sancar et al., 2004) y ausente en los criptocromos, con la excepción

de los criptocromos DASH (de *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, y Humano). Se han descrito criptocromos y fotoliasas en todos los grupos de organismos, desde bacterias y arqueas hasta eucariotas (Lucas-Lledó et al., 2009; Chaves et al., 2011). La familia criptocromo-fotoliasa se divide en 7 subfamilias: fotoliasas de CPD (*cyclobutane pyrimidine dimer*) de clase I, de clase II y de clase III, criptocromos de plantas, criptocromos de animales, 6-4 CPD fotoliasas y criptocromos CRY-DASH (Bayram et al., 2008; Daiyasu et al., 2004, Müller et al., 2009). Los criptocromos constan de una región N-terminal similar a una fotoliasa (PHR), al que se unen dos cromóforos, flavín-adenín dinucleótido (FAD) y 5,10-meteniltetrahidrofolato (MTHF)/pterina (Lin et al., 2003). la región fotoliasa le sigue un dominio carboxilo terminal de longitud variable, al que se le asignan funciones de transducción de la señal. Sin embargo, se ha observado que los criptocromos de la familia CRY-DASH son capaces de unirse a ADN de cadena sencilla (Selby et al., 2006; Pokorny *et al.*, 2008). Algunos criptocromos vegetales están implicados en regulación fotosensorial del crecimiento, desarrollo, señalización celular, ritmo circadiano e incluso en magnetorrecepción (Liedvogel et al., 2010). Si bien la función básica de los criptocromos en las plantas es la percepción de luz (Chaves *et al.*, 2011), queda por esclarecer su función en hongos. En el cigomiceto *P. blakesleeanus*, que carece de fotoliasas, la función reparadora parece ser llevada a cabo por un criptocromo DASH (Tagua et al., 2015)

Las fotoliasas y criptocromos DASH reparan los dímeros de timinas en el ADN mediante una cadena de transporte de electrones cedidos desde el cromóforo FAD (Lin et al., 2005). La organización estructural y el mecanismo de acción por el que los criptocromos DASH actúan es similar al de las fotoliasas. En los casos en los que no actúan como fotoproteínas reparadoras, su función podría ser iniciar una cascada de señalización. *In vivo*, los criptocromos DASH no complementan la actividad de las fotoliasas (Froehlich et al., 2010; Worthington et al., 2003), con la excepción de criptocromo DASH de *P. blakesleeanus* (Tagua et al., 2015).

En comparación con otros grupos taxonómicos, se dispone de poca información sobre los criptocromos y fotoliasas de hongos. Los primeros indicios de funciones sensoriales por proteínas de esta familia en hongos provienen de los estudios de la fotoliasa Phr1 de *T. atroviride* (Berrocal-Tito et al., 2007). En esta especie la fotoliasa es responsable de la reparación de lesiones inducidas por

radiación UV, pero también regula su propia expresión, posiblemente por inhibición del complejo WC, y la de otros cuatro genes dependientes de luz azul. Otro ejemplo de funciones regulatorias de fotoliasas lo encontramos en *Cercospora zeae-maydis*, que posee dos genes para fotoliasas: *phl1*, que determina una 6-4 fotoliasa, y *cpd1*, que cifra otra fotoliasa. La mutación de *phl1* elimina la fotorreactivación y desregula la expresión de *cpd1*, así como la de otros genes implicados en reparación de daños en el ADN. Las funciones reguladoras de Phl1 están relacionadas también con la conidiación y con la inducción por luz de la síntesis de cercosporina (Bluhm and Dunkle, 2008).

Algunos trabajos han descrito funciones regulatorias para criptocromos. En *A. nidulans*, el criptocromo CryA, que también posee actividad fotoliasa (Bayram et al., 2008), reprime en presencia de luz el desarrollo sexual, y los mutantes carentes de CryA presentan mayores niveles de expresión para genes relacionados con este proceso. Además dichos mutantes también muestran fenotipos no dependientes de luz, como defectos en el crecimiento y en la biosíntesis de toxinas. En *Sclerotinia sclerotiorum*, el criptocromo Cry1 participa en la producción de los esclerocios y en algunos aspectos del desarrollo de los apotecios, pero no es la proteína principal en la fotorreactivación. En este hongo la radiación UV-A es necesaria para que el apotecio sea fértil. Aunque la proteína Cry1 puede tener una función durante la exposición a la radiación UV, no es esencial para completar el desarrollo completo de su ciclo de vida bajo condiciones de laboratorio (Veluchamy y Rollins, 2008).

En *N. crassa* el gen *cry*, que determina el único criptocromo en este hongo, es regulado por ritmo circadiano, y su mutación apenas tiene efectos fenotípicos, salvo un leve retraso en la entrada en dicho ritmo (Froehlich et al., 2010, Olmedo et al., 2010, Veluchamy and Rollins, 2008). El criptocromo CRY es capaz de unirse a ADN y ARN de cadena sencilla y doble pero no hay evidencia de que tenga actividad fotoliasa *in vivo*. El ARNm de *cry* y los niveles de proteína CRY son inducidos por luz azul a través de la acción del complejo WC y es regulado por el ritmo circadiano (Froehlich et al., 2010). Se ha descrito actividad represora de la transcripción para criptocromos CRY-DASH (Brudler et al., 2003), por lo que se ha propuesto que CRY de *Neurospora* puede funcionar como modulador de la actividad transcripcional del complejo WC sobre algunos genes, como *con-10*, *al-1* o *vvd* (Olmedo et al., 2010).

*F. fujikuroi* posee dos genes para criptocromos, uno de los cuales, el criptocromo DASH CryD, ha sido objeto de estudio anteriormente en el grupo donde

se ha desarrollado este trabajo. La expresión del gen *cryD* es fuertemente estimulada por la luz a través de la proteína White Collar WcoA, y su mutación dirigida produce diferentes alteraciones fenotípicas en condiciones de iluminación pero no en la oscuridad (Castrillo et al., 2015). Las alteraciones observadas afectan a la morfología, la conidiación y la producción de metabolitos secundarios, lo que muestra un papel regulatorio complejo. CryD es capaz de ligar los dos cofactores característicos de esta familia de proteínas, el FAD y el metenil tetrahidrofolato (MTHF), y es capaz de unirse *in vitro* a moléculas de ADN, con independencia de la presencia o no de daños en dichas moléculas. Sin embargo, los mutantes nulos para *cryD* no muestran cambios en su sensibilidad a radiación UV en la luz, lo que indica que la fotorreactivación es fundamentalmente llevada a cabo *in vivo* por la fotoliasa del hongo (Castrillo et al., 2015)

#### 4.4 Fitocromos

Los fitocromos poseen cromóforos tetrapirrólicos lineares (bilinas), que les permite absorber luz en la región roja y roja lejana del espectro (Rockwell et al., 2006). Estos fotorreceptores fueron identificados inicialmente en plantas (Borthwick et al., 1952) pero están presentes también en hongos y en bacterias (Karniol et al., 2005). Los fitocromos tienen un módulo fotosensor en el extremo amino que consta de un dominio PAS, presente solo en fitocromos de bacterias y hongos, un dominio GAF (cGMP fosfodiesterasa/Adenilato ciclase/FhIA) con actividad bilin liasa, que incluye la cisteína conservada que une el cromóforo, un dominio exclusivo llamado PHY, y un módulo regulador en su extremo carboxilo terminal muy variable en función de la especie, pero que siempre contiene un dominio relacionado con las quinasas de histidina o HKRD (Mathews et al., 1996).

Los fitocromos son proteínas solubles que aparecen en dos formas interconvertibles y que se distinguen por su estructura y su máximo de absorción. La absorción de luz roja provoca cambios conformacionales del cromóforo seguidos de cambios conformacionales de la proteína, que van acompañados de cambios en los máximos de absorción. La forma Pfr puede absorber luz del rojo lejano y volver a la forma Pr. La relación cuantitativa entre ambas formas determina el estado de señalización del fitocromo. En la mayoría de los casos, las respuestas son inducidas

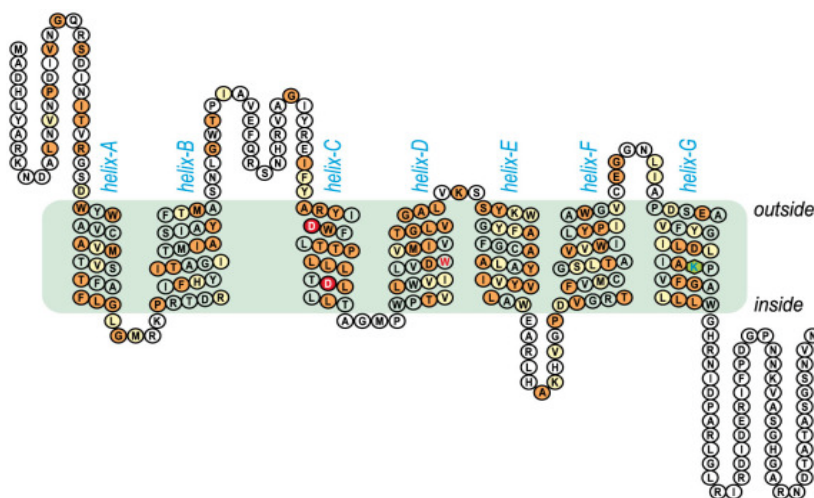
por la luz roja y revertidas por el rojo lejano, dando lugar al concepto de que la forma Pfr es la forma biológicamente activa.

Se han descrito genes para fitocromos en hongos ascomicetos, como *A. nidulans* (Blumenstein et al., 2005), *N. crassa* (Froehlich et al., 2005; Borkovich et al., 2004; Galagan et al., 2003), *M. oryzae*, *Botrytis cinerea*, *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* y *T. atroviride*, entre otros (Idnurm et al., 2010), y en los basidiomicetos *Ustilago maydis*, *Cryptococcus neoformans* (Idnurm et al., 2005) y *Pleurotus ostreatus* (Rodríguez-Romero et al., 2010). No se han encontrado fitocromos en los proteomas de hongos cigomicetos. En *N. crassa* PHY-2 está implicado en la modulación de la actividad del complejo WC (Olmedo et al., 2010). En *F. fujikuroi*, la iluminación con luz roja produce una inducción significativa de la expresión de varios genes, incluyendo *vvdA*, *cryD* y el gen de la carotenogénesis *carRA*. Esta fotoinducción es dependiente de WcoA, y da lugar a una sensible fotoinducción de la síntesis de carotenoides, sugiriendo la participación de un fitocromo en el sistema fotosensorial que regula esta respuesta (Castrillo et al., 2015). De igual manera, en *T. reesei* la luz roja induce la expresión de algunos genes, por lo que se sospecha la participación de un fitocromo (Rosales-Saavedra et al., 2006). En *A. nidulans*, el fitocromo FphA posee una función sensorial, ya que regula la transición de ciclo asexual a sexual y la biosíntesis de metabolitos secundarios en respuesta a la luz. También posee una función represora en la formación de cleistotecios (Rodríguez-Romero et al., 2010) y está implicada en la activación por la luz del gen *brlA* (Ruger-Herreros et al., 2011).

#### 4.5 Rodopsinas

Las rodopsinas son proteínas integrales de membrana con siete hélices transmembranales (Fig. 19) con una estructura tridimensional altamente conservada, y que unen una molécula de retinal como cromóforo mediante unión covalente con un residuo de lisina. Las rodopsinas se descubrieron inicialmente en arqueas, siendo la bacteriorodopsina de *Halobacterium* la mejor conocida a nivel estructural y funcional, destacando por su capacidad de bombear protones usando la luz como fuente de energía. La primera rodopsina descubierta en hongos fue NOP-1 de *N. crassa*, con similitud a las rodopsinas de arqueas. Se ha demostrado la capacidad de NOP-1 de unir retinal como cromóforo (Bieszke et al., 1999), pero la inactivación de su gen no mostró un fenotipo evidente. A nivel de expresión, existe una relación de *nop-1* con la

conidiación, ya que los niveles de ARNm del gen aumentan al inducirse la formación de conidios por el contacto del micelio con el aire (Bieszke et al., 2007).



**Figura 19. Estructura predicha para la rodopsina CarO de *F. fujikuroi*.** Los residuos conservados se resaltan en color naranja y los residuos relacionados en amarillo. En rojo se representa el aceptante de protones y de los donantes, respectivamente.

*F. fujikuroi* posee dos genes para rodopsinas, *carO* y *opsA*. El gen *carO* se identificó por su proximidad a genes relacionados con la síntesis de carotenoides (Prado et al., 2004). La transcripción de *carO* es inducida por la luz pero la mutación del gen *carO* no produjo ningún cambio fenotípico (Prado et al., 2004). Recientemente se ha comprobado que CarO es una bomba de protones capaz de responder a luz verde (García-Martínez et al., 2015).

Tampoco produce un fenotipo aparente la mutación de la segunda opsina, *opsA*, salvo una disminución moderada en los niveles de ARNm de los genes *car*, que no se traduce en alteraciones en el contenido de carotenoides (Estrada et al., 2009). La comparación de secuencias sugiere que OpsA es ortólogo de Nop-1 de *N. crassa*, careciendo éste hongo de un ortólogo para CarO. Existe un tercer gen en *F. fujikuroi* para una proteína de esta familia, denominada HspO, pero se trata en este caso de una ORP (opsin-related protein), presuntamente no fotoactiva, ya que carece de la lisina de unión del retinal (Estrada y Ávalos, 2009). HspO es ortóloga a YRO2 de *N. crassa* y Hsp30p de *Saccharomyces cerevisiae*, llamada así por ser inducible por choque térmico (Zhai et al., 2001). Por esta última característica, se sospecha que puede jugar un papel de chaperona (Estrada, 2009).



La presencia de genes para rodopsinas en los genomas de hongos es variable en número, estando ausente en muchos casos (Brown, 2004). Los estudios filogenéticos en diferentes grupos taxonómicos sugieren en algunos casos sucesos de transferencia horizontal (Sharma et al., 2006), como puede haber sido el caso en los hongos con la adquisición de una rodopsina de haloarqueas por un ancestro de ascomicetos y basidiomicetos (Ruíz-González y Marín, 2004). El gen *ops* de , que parece funcionar como bomba de protones (Sumii et al., 2005, Waschuk et al., 2005) y su actividad es dependiente de pH (Idnurm y Howlett, 2001)

## 5. Regulación por nitrógeno

Los hongos son capaces de utilizar una gran variedad de fuentes de nitrógeno, pero en caso de tener más de una disponible muestran preferencia por el amonio y la glutamina (Schure et al., 2000). En consecuencia, en presencia de estos nutrientes se reprimen los genes necesarios para la utilización de fuentes de nitrógeno alternativas, un proceso conocido como represión por catabolitos del nitrógeno (Marzluf et al., 1997, Wong et al., 2008). La implicación del amonio en la regulación del metabolismo del nitrógeno ha sido ampliamente estudiada en algunos hongos, como *A. nidulans* y *N. crassa* (Marzluf et al., 1997, Caddick et al., 2004, Wong et al., 2008).

En ausencia de fuentes de nitrógeno favorables, se inicia la síntesis de novo de permeasas y enzimas catabólicas necesarias para la asimilación de fuentes de nitrógeno alternativas, como pueden ser nitratos, purinas, proteínas y amidas (Caddick et al., 1994, Marzluf et al., 1997). La expresión de tales genes es controlada por un mecanismo regulador global que permite su expresión coordinada y que hace posible un adecuado aporte de nitrógeno en función de su disponibilidad nutricional. Además del control global, los juegos de genes específicos para diferentes fuentes de nitrógeno pueden tener reguladores específicos que sensen la presencia de la correspondiente fuente, de forma que la expresión no se ponga en marcha en su ausencia. Ese es el caso del nitrato, cuyos niveles intracelulares son uno de los principales puntos de control de la ruta metabólica.

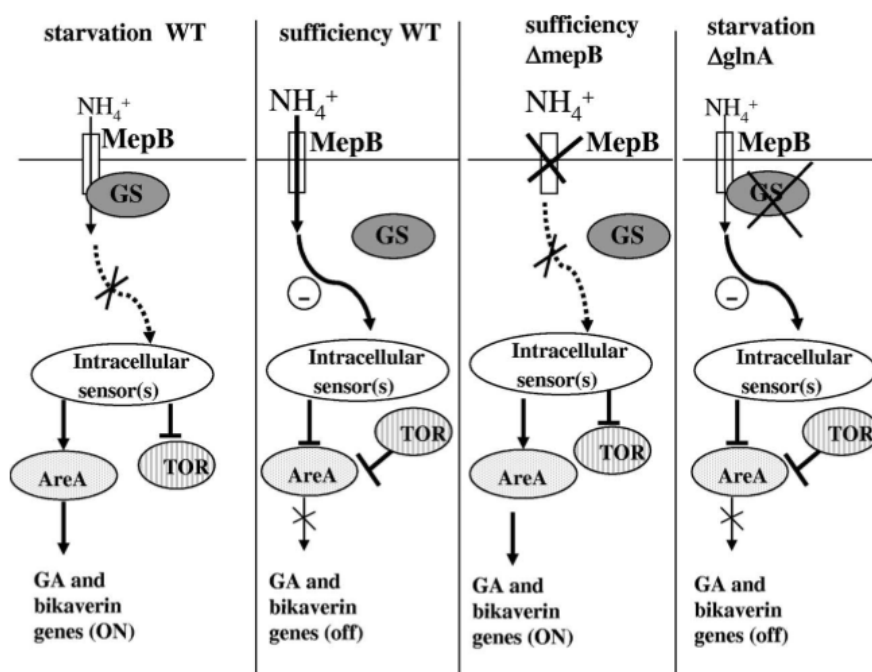
La regulación por catabolitos de nitrógeno es un fenómeno muy extendido en los hongos, aunque pueden existir diferencias en los elementos participantes y rutas de señalización implicadas. En los casos investigados, dicho control global es



mediado por un regulador positivo denominado AreA en *A. nidulans* y *F. fujikuroi*, Nnu en *Gibberella zeae* (*Fusarium moniliforme*), NIT-2 en *N. crassa*, o Nre en *Penicillium chrysogenum* (Marzluf et al., 1981, Fu et al., 1987; Dickman y Leslie, 1992; Tudzynski et al., 1999). Estas proteínas son factores de transcripción con un dedo de zinc tipo Cys-X2-Cys-X27-Cys-X2-Cys y una región adyacente que constituyen el dominio de unión al ADN. Sus secuencias de aminoácidos presentan sólo un 30% de identidad entre distintas especies. En cambio, sus dominios de unión al ADN tienen una identidad del 97%. Estos factores se engloban en el grupo de la familia GATA, ya que reconocen la secuencia consenso 5'-(A/T)GATA(A/G)-3' presente en la región promotora de los genes sujetos a su regulación (Merika et al., 1993, Marzluf et al., 1997). A veces, la interacción del factor se produce con dos elementos GATA separados por un número variable de bases, entre 3 y 30 nt (Chiang et al., 1994). La ausencia de fuentes preferentes de nitrógeno causa la unión de estos factores a los promotores de genes implicados en la utilización de fuentes de nitrógeno alternativas activando su expresión (Chiang et al., 1994, Chiang et al., 1995, Kudla et al., 1990). En consonancia con este papel regulador, los mutantes que pierden la función de *areA* y *nit-2* son incapaces de utilizar cualquier fuente de nitrógeno diferente de glutamina y amonio (Arst et al., 1973; Marzluf, 1997).

En *S. cerevisiae* y *A. nidulans* la principal señal responsable de la represión por catabolitos del metabolismo del nitrógeno es la glutamina, y no el amonio (Margelis et al., 2001, Crespo et al., 2002). En *F. oxysporum* el amonio provoca además la inhibición de la virulencia, pero dicha inhibición no la produce la glutamina (López-Berges et al., 2010). Por tanto el efecto represor del amonio en las funciones de virulencia podría deberse a un mecanismo independiente a la represión por catabolitos. Además, el mutante nulo en el gen *meaB*, un regulador positivo del catabolismo del nitrógeno, es capaz de penetrar el celofán, adherirse a raíces, realizar fusión vegetativa de hifas e infectar la planta en presencia de amonio (López-Berges et al., 2010). Otra proteína implicada en la represión de dichas funciones de virulencia es la proteína quinasa TOR, un regulador maestro del crecimiento celular en respuesta a nutrientes (Crespo et al., 2002, De Virgilio et al., 2006, Wullschleger et al., 2006, Rohde et al., 2008). En *F. oxysporum* la penetración del celofán, la fusión de hifas, la adhesión a la raíz y la infección de plantas de

tomate se inhiben en presencia de amonio, mientras permanecen activas en nitrato (López-Berges et al., 2010). La asimilación de nitrógeno tiene relevancia no solo en patogenicidad, sino también en el metabolismo secundario. La síntesis de giberelinas se produce preferentemente cuando las condiciones de nitrógeno son limitantes. Este aumento va acompañado de una activación de los genes del *cluster*, dependientes de AreA (Mihlan et al., 2003). AreA se une a los promotores de los genes *gib*, de modo que el mutante AreA no puede sintetizar giberelinas por no poder activarse su expresión (Tudzynski, 1999). Por su parte, la síntesis de bikaverina se ve afectada por enzimas como GlnA (Teichert et al., 2004), MepB y MepC (Teichert et al., 2008) y la quinasa TOR (Teichert et al., 2006). También la fuente y disponibilidad de nitrógeno está implicado en la producción de fusarinas (Díaz-Sánchez et al., 2012).



**Figura I10: Modelo de regulación por nitrógeno en *F. fujikuroi*.** La permeasa de amonio MepB se postula como un componente clave en este modelo. Se postula que MepB puede actuar como sensor de nitrógeno, ya sea por mediación de la señal de disponibilidad de nitrógeno o indirectamente, provocando una caída en el nivel de glutamina intracelular. El destino de la cadena de señalización es AreA, que actúa directamente sobre la expresión de diferentes juegos de genes. La actividad de AreA es modulada por otras proteínas, entre ellas TOR (Teichert et al., 2008).

### 5.1. Asimilación de nitrato

El nitrógeno es un componente esencial para la vida. Las interconversiones de las distintas especies de nitrógeno en la naturaleza conforman un ciclo biogeoquímico en el que participan organismos procariotas y eucariotas, destacando entre ellos las bacterias (Richardson et al., 1999). En dicho ciclo el nitrógeno pasa por distintos estados de oxidación, siendo el más abundante el del dinitrógeno ( $N_2$ ), componente mayoritario de la atmósfera y que sólo unos pocos organismos pueden utilizar como fuente asimilable de nitrógeno (Scharff, et al., 2003). En este ciclo desempeña un papel relevante la desnitrificación, un proceso metabólico en el que el nitrato es utilizado como aceptor terminal de electrones en condiciones de escasez de oxígeno (ver ruta inferior), pasando por varios intermediarios (nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso). Aunque la desnitrificación es característica de bacterias anaerobias, también es llevada a cabo por algunos hongos, incluyendo entre ellos especies del género *Fusarium* (Kobayasi et al., 1995, Takaya et al., 2002).

Desnitrificación	$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$
Asimilación de nitrato	$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NH_4^+$

Las plantas y algas, así como muchas bacterias, levaduras y hongos filamentosos, son capaces de incorporar nitrógeno a partir de nitrato mediante un mecanismo de reducción de este compuesto (Siverio et al., 2002). La ruta de asimilación de nitrato, mostrada arriba, está altamente conservada y consta de tres pasos: la entrada de nitrato al interior celular, un proceso activo que se produce contra gradiente, la reducción de nitrato a nitrito por la reductasa de nitrato, y la reducción de nitrito a amonio por la reductasa de nitrito. El amonio es utilizado para la síntesis de aminoácidos gracias a la deshidrogenasa de glutamato y la sintasa de glutamina (Magasanik et al., 2002). El uso del nitrato como fuente de nitrógeno conlleva un enorme gasto energético debido no solo a que el transporte se realiza en contra de gradiente, sino a que la conversión va desde el estado de oxidación +5 al -3, y a que es necesaria la incorporación posterior del amonio a intermediarios carbonados (Crawford et al., 1993). Por ello, las células recurren a complejos sistemas de regulación transcripcional y postraducciona con el fin de adaptar la actividad de esta vía de asimilación a los requerimientos nutricionales y a la disponibilidad de

nitrógeno.

La entrada de nitrato al interior celular es el primer paso de la vía deasimilación. La concentración interna es el resultado del balance entre la cantidad de nitrato transportado al interior celular y la cantidad de nitrato excretado. En plantas la excreción de nitrato aumenta al elevarse su concentración intracelular (Macduff et al., 1992) y se regula por mecanismos diferentes a los que modulan el transporte de nitrato, pues mientras la excreción es estimulada por amonio (Aslam et al., 1996), el consumo de nitrato es inhibido (Lee et al., 1989). Se conocen diferentes tipos de transportadores de nitrato, tanto específicos como capaces de transportar además otros sustratos. Generalmente se observa una gran variedad de sistemas de transporte, supuestamente con el objetivo de asegurar el transporte de nitrato en un amplio rango de condiciones ambientales. Los transportadores de nitrato se pueden agrupar en dos clases; la familia NNP (Nitrate Nitrite Porter), constituida por transportadores de nitrato y nitrito (Forde et al., 2000), y la familia PTR o POT, que engloba principalmente cotransportadores  $H^+$ /oligopéptidos (Tsay et al., 2007), presentes ambos tipos tanto en procariotas como en eucariotas. Como ejemplo de regulación, se ha sugerido para el transportador NrtA de *A. nidulans* un mecanismo de inactivación postraducciona para evitar un exceso de entrada de nitrato (Wang et al., 2007). Los cambios en la concentración extracelular de nitrato causan un cambio de afinidad mediante un mecanismo dependiente de la fosforilación de un residuo de treonina; cuando los niveles de nitrato son elevados, el transportador se encuentra desfosforilado. Este mecanismo permite un rápido ajuste del transporte de nitrato a través de este transportador en función de las condiciones del medio (Liu et al., 2003).

Las reductasas de nitrato (NR, de *nitrate reductase*) se dividen en tres clases (Hansch et al., 2001): NADH-NR, presente en los sistemas asimiladores de las plantas superiores y algunas algas, NAD(P)H-NR en *S. cerevisiae* y algas verdes, y NADPH-NR, en hongos filamentosos. La reductasa de nitrato fotosintética posee molibdeno, elemento esencial para los vegetales solamente en condiciones en que tengan que asimilar  $NO_3^-$  o  $N_2$  (Neubauer et al., 1999). En *Nicotiana tabacum* la iluminación incrementa la reducción del nitrato a nivel de transcrito (Matt et al., 2001).

En *N. crassa* y *A. nidulans* la asimilación de nitrato es controlada por dos factores transcripcionales específicos, Nit4 y NirA (Burguer et al., 1991, Yuan et al., 1991). Se trata de factores del tipo GAL4, con un dominio de unión al ADN

consistente en un dedo de zinc del tipo  $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$  y otro dominio activador de la transcripción. La función activadora de estos factores requiere su unión con los factores globales de tipo GATA, NIT2 y AREA y de su localización celular (Berger et al., 2006, Bañuelos et al., 1995, Marzluf et al., 1997). NirA se localiza en el citoplasma en ausencia de nitrato y se acumula en el núcleo en presencia del mismo, activando así la expresión de los genes inducidos por nitrato. La permanencia de NirA en el núcleo es posible porque el nitrato bloquea la interacción de NirA con la maquinaria implicada en la exportación nuclear, más concretamente a nivel del factor KapK (Bernreiter et al., 2007).

El análisis de mutantes de *F. moniliforme* incapaces de utilizar nitrato como fuente de nitrógeno, identificados por su resistencia a la presencia de clorato en el medio de cultivo, revela la existencia de un gen regulador específico similar a Nit4 y NirA, *N. crassa* y *A. nidulans*, que se llamó *nit3* (Klittich y Leslie, 1988). Resultados similares se han obtenido en *F. oxysporum* (Correll et al. 1987) y en *F. fujikuroi* (datos no publicados). Este método de selección, basado en la toxicidad del clorito producido a partir de clorato por la reductasa de nitrato, no permite obtener mutantes del gen *areA* (*nnu*) en las especies analizadas de *Fusarium*, probablemente porque en ausencia de AreA hay aún un nivel suficiente de expresión como para intoxicarse a partir de clorato en el ensayo. Dicho resultado cuadra con la elevada actividad reductasa de nitrato que se encuentra en *F. fujikuroi*, incluso en presencia de amonio en el medio (Sánchez-Fernández et al., 1997), condiciones en las que se espera la actividad más baja de AreA.

## 6. Regulación por estrés

En la naturaleza, la supervivencia de los microorganismos exige la disponibilidad de mecanismos eficaces de adaptación a las condiciones fluctuantes del medio ambiente. Éstos no sólo deben responder a cambios en la disponibilidad de nutrientes, como el nitrógeno, o de exposición a la luz como fuente de información (ya discutidos en secciones anteriores), sino que se enfrentan a posibles cambios en otras condiciones físico-químicas de gran relevancia para su supervivencia, como son la temperatura, el pH o a la presencia de compuestos químicos perniciosos, como pueden ser los derivados del estrés oxidativo o de la presencia de metales pesados.

## 6.1 Estrés térmico

Los seres vivos están adaptados a desarrollarse dentro de un determinado intervalo de temperatura. Cuando ésta supera ciertos valores críticos la célula se enfrenta a una situación de estrés térmico, capaz de provocar daños importantes, y que pueden llegar a ser letales si el estrés alcanza un grado o tiempo suficiente. Entre los daños más importantes producidos por el estrés térmico se encuentra la desnaturalización pueden agregarse formando complejos insolubles. También produce estrés las temperaturas excesivamente bajas. Aquí nos referiremos a estrés térmico como aquel derivado de la exposición a temperaturas anormalmente elevadas.

La mayoría de los organismos reducen su metabolismo a temperaturas superiores a 40°C y sufren reacciones en cadena derivadas del estrés térmico. Cuando la temperatura supera los límites aceptables, se alteran las actividades enzimáticas, y se produce la desnaturalización e inactivación de enzimas metabólicas (Vierling et al., 1991, Kampinga et al., 1995). Además se producen daños en las membranas (Larkindale et al., 2002) y se desencadena la muerte celular programada (Vacca et al., 2004). Los seres vivos poseen mecanismos para paliar las consecuencias del estrés térmico y, en su caso, para evitar que su temperatura interna alcance niveles excesivos y contrarrestar al menos parcialmente, el calor. Estudios con plantas en condiciones de suficiente humedad revelaron que cuando las temperaturas superan los 5 grados sobre el óptimo de crecimiento, la síntesis de la mayor parte de las proteínas y ARNm disminuye drásticamente, mientras que se inicia la transcripción y traducción de un conjunto de genes asociados a la tolerancia al estrés térmico. Las proteínas resultantes de esta inducción se llaman genéricamente Proteínas de Choque Térmico o HSPs, de *Heat Shock Proteins* (Nover et al, 1984; Lindquist et al., 1986). Este fenómeno está muy conservado tanto en eucariotas como en procariotas, lo que sugiere que las HSPs forman parte de mecanismos defensivos desarrollados por los seres vivos muy temprano en la evolución. Las HSPs se inducen también por otros agentes estresantes, como el etanol, los metales pesados, el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, o la inhibición del transporte de electrones, así como por ciertas señales celulares, como son ciertas hormonas esteroideas y prostaglandinas (Lindquist, 1992). La subida excesiva de temperatura produce también un

desacoplamiento entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP, la cadena del transporte de electrones y la peroxidación lipídica (Mishra et al., 1992). Una consecuencia negativa del aumento de la actividad mitocondrial es la generación de un aumento del nivel de estrés oxidativo (Larkindale et al., 2002, Vacca et al., 2004), del que se trata en la sección siguiente.

Las HSPs están ampliamente distribuidas en la naturaleza, donde se han observado en las células de todos los organismos, desde procariotas a eucariotas, y figuran entre las moléculas más altamente conservadas que se conocen, tanto en estructura primaria, como en sus funciones bioquímicas y en su regulación (Minowada et al., 1995). En las células eucarióticas se encuentran en diferentes compartimentos celulares, como el citoplasma, la mitocondria, el cloroplasto y el retículo endoplasmático. Muchas HSPs actúan como chaperonas moleculares. Las chaperonas facilitan el plegado correcto de otras proteínas, uniéndose de forma reversible a las zonas desplegadas de los polipéptidos.

Las HSPs se clasifican en familias atendiendo a su peso molecular. Entre las más conocidas figura la Hsp70, de 70 kDa. Otras familias son más heterogéneas. La familia Hsp90 incluye HSPs con pesos moleculares entre 80 y 110 kDa, y la familia Hsp60 incluye HSPs entre 58 y 65 kDa. Otra familia engloba las HSPs de bajo peso molecular, cuyas masas oscilan entre 15 y 45 kDa, y se incluyen en la familia Hsp10. HSP10 y HSP60 trabajan de forma coordinada para conseguir el ensamblaje correcto de otras proteínas, siendo Hsp10 cofactor de Hsp60. Una HSP de particular interés es la ubiquitina, de tan solo 76 aminoácidos, utilizada como señal de marcaje de proteínas para su degradación (Cascales, 2002).

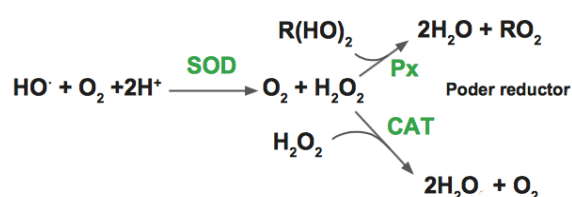
## 6.2. Estrés oxidativo

El oxígeno es un elemento indispensable para la vida, pero puede sufrir sucesivas reducciones donde se generan moléculas altamente tóxicas denominadas especies reactivas del oxígeno (ROS, de *reactive oxygen species*). Las ROS más conocidas son los iones superóxido, el peróxido de hidrógeno o los radicales hidroxilo. La generación de ROS puede ocurrir por reacciones químicas espontáneas o enzimáticas o por efecto de radiaciones ionizantes. Las ROS constituyen un grupo de especies químicas muy reactivas, con capacidad prooxidantes, capaces de reaccionar con todos los componentes básicos de la célula y producir por tanto daños celulares



(Koob et al., 2001, Halliwell et al., 2000). Las ROS dañan proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, llevando finalmente a la muerte celular o a la aparición de tejidos necrosados (Doke, et al., 1997; Foyer et al., 2005). Las células poseen actividades enzimáticas destinadas a contrarrestar las ROS. El estrés oxidativo puede deberse tanto al aumento de los niveles de ROS en el entorno como al descenso en los mecanismos de protección frente a ellos, o a ambas causas simultáneamente (Davies et al., 1999). En plantas, las respuestas a diferentes tipos de estrés, tanto biótico (presencia de patógenos) como abióticos (salinidad, sequía, herbicidas, o bajadas de temperatura), pueden producir aumentos en los niveles de ROS (Palma et al., 2002, Sandalio et al., 2001).

Con independencia de que puedan generarse en cantidades anormalmente altas por causas externas, los ROS son producidos de forma basal como resultado del metabolismo aerobio. La célula está provista de diferentes mecanismos para paliar o reducir dicho estrés oxidativo a niveles tolerables. Dentro de las líneas de defensa están los antioxidantes enzimáticos, como la superóxido dismutasa, la catalasa, y la glutatión peroxidasa (Sahnoun et al., 1997). Además de las enzimas detoxificadoras, algunas de las cuales son objeto de las secciones siguientes, en la células existen moléculas con actividad antioxidante, como el ácido ascórbico, el glutatión, los tocoferoles, o los carotenoides, de especial interés en el caso de los organismos productores, como es el caso de *F. fujikuroi*. Entre ellos destaca el licopeno como un potente neutralizador de radicales libres (óxido y peróxido), atenuando los daños oxidativos sobre los tejidos (Río-Olague et al., 2006). Un aspecto positivo de la generación de ROS es que puede desempeñar un papel importante como señal para responder a infección por patógenos, estrés ambiental y muerte celular programada (Mittler et al., 2004, Torres y Dangl, 2005).



**Figura I11.** Reacciones coordinadas de los distintos antioxidantes enzimáticos. SOD: superóxido dismutasa, PX: peroxidasa, CAT: catalasa.



### 6.2.1. Catalasas

Las catalasas son enzimas que llevan acabo una reacción de dismutación de dos moléculas de  $H_2O_2$  en agua y  $O_2$ . El  $H_2O_2$  ejerce la función de señal en la regulación de algunos procesos biológicos, como la interacción de las plantas con los patógenos (Mhamdi et al. 2010). En plantas de *Vigna mungo* la actividad de catalasas disminuye cuando son inoculadas con *Trichoderma viridae*, *Alternaria alternata* y *F. oxysporum* mientras que en las plantas enfermas aumenta dicha actividad (Surekha et al., 2013).

Las catalasas son enzimas con un papel importante en la detoxificación de ROS generadas por estrés (Garg et al., 2009), incluyendo el estrés por metales pesados (Hasan et al., 2008, Singh et al., 2008), salinidad (Eyidogan et al., 2007), y sequía (Simova-Stoilova et al., 2010). Participan también en la detoxificación las peroxidasas, que a diferencia de las catalasas degradan  $H_2O_2$  oxidando una amplia variedad de sustratos. Las peroxidasas, además de participar en la defensa frente a patógenos y estrés biótico (McLusky et al., 1999, Ros-Barcelo et al., 2003) están implicadas en otros procesos fisiológicos, como la síntesis de metabolitos secundarios (Awad et al., 2000; Sottoymayor et al., 2004), o la producción de suberina y lignina en plantas (Quiroga et al., 2000; Pomar et al., 2002).

Existe un interés creciente acerca del papel de las catalasas (CATs) y otras enzimas antioxidantes en los hongos, en especial en los hongos fitopatógenos, ya que se asocian a la resistencia de los patógenos al  $H_2O_2$  durante la respuesta inmediata de las células vegetales (Levine et al., 1994). En los compartimentos celulares de la célula vegetal donde no se detectan catalasas, como citosol, mitocondrias y cloroplastos, se ha observado la presencia de ascorbato peroxidasa, que cataliza la transformación de  $H_2O_2$  mediante la oxidación del ascorbato, y que junto a otras enzimas forma parte del ciclo del ascorbato-glutación, conocido también como ciclo Halliwell-Asada-Foyer (Smirnoff et al., 2000).

Las catalasas típicas son homotetraméricas, con masas moleculares entre 200 y 350 KDa, y contienen un hemo como grupo prostético. Otro tipo de catalasas, llamadas pseudo-catalasas, contienen manganeso, y están presentes en algunas bacterias aerobias facultativas y que son capaces de sintetizar el grupo hemo prostético. Otro grupo lo constituye las catalasas-peroxidasas o catalasas bifuncionales, que son hidroperoxidasas que se reducen por ditionito, son inactivadas

por el propio sustrato a concentraciones mayores de 5 mM y son insensibles al 3-amino triazol. La gran mayoría de catalasas-peroxidasas aisladas en bacterias son homotetrámeros, aunque existen algunos dímeros (Beltrán-García et al., 2006)

Los hongos suelen tener más de una actividad catalasa, localizadas mayoritariamente en el citoplasma. La especie fitopatógena *Claviceps purpurea*, que parasita numerosas plantas, posee cuatro catalasas y una de ellas, llamada CatD, es extracelular, secretándose en cultivos *in vitro* y en contacto con el huésped (Garre et al., 1998). La mutación del gen *catD*, sin embargo, no afecta la virulencia y no parece desempeñar un papel importante en la colonización de la planta (Garre et al., 1998). Sin embargo, las catalasas intracelulares atenúan la respuesta del huésped, y favorecen la implantación y el desarrollo de la enfermedad. La presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce el gen *cpcat1*, que codifica para una catalasa, y cuyo mutante presenta una respuesta a estrés oxidativo menor (Nathues et al. 2004). Los mutantes carentes de *cpcat1* mostraron una virulencia reducida sobre el centeno, pero provocan, sin embargo, estrés oxidativo en la planta, lo cual no ocurre con la cepa silvestre. La causa es la secreción de mayor cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por el mutante al tener déficit de catalasas. Otro hongo investigado a este respecto es *Cladosporium fulvum*, un agente biotrófico que crece en los espacios intercelulares de hojas en variedades susceptibles de tomate. En la infección de líneas resistentes de tomate aumenta la generación de ROS. En *C. fulvum* existen 4 catalasas, 3 monofuncionales y una catalasa peroxidasa. Una de ellas se ubica en la pared celular y es probable que sea secretable (Bussink et al., 2001).

La relación entre catalasas y virulencia ha recibido también atención en *Cochliobolus heterostrophus*, un agente patógeno del maíz (*Zea mays* L.). Este hongo presenta genes para al menos tres catalasas monofuncionales. El análisis de sus secuencias muestra que Cat-3 posee una secuencia señal para enzimas de secreción y que Cat-1 tiene subunidades pequeñas. CAT1 es una pequeña subunidad catalasa que se ha agrupado en el grupo III, por ser distinta a las grandes catalasas de subunidades del grupo II. Todas las catalasas peroxisomales conocidas se agrupan en el grupo III. Sin embargo, CAT1 no contiene los motivos que se asocian a catalasas peroxisomales (Gould et al 1989, Swinkels et al 1991). En este hongo se ha investigado la sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la virulencia en el maíz de mutantes sencillos, dobles y triples de sus tres genes de catalasas. Los mutantes deficientes de *cat-3* presentan una mayor

sensibilidad a  $H_2O_2$  en comparación con la cepa silvestre o con mutantes deficientes de *cat-1*, *cat-2*, o ambos. Las mutantes, sin embargo, no tienen alterada su virulencia en el maíz. Se concluye que Cat-3 es secretable y que protege al hongo del estrés oxidativo durante el crecimiento vegetativo, pero ni esta ni las otras dos catalasas juegan un papel relevante en la virulencia del hongo (Robbertse et al., 2003).

### 6.2.2. Otras enzimas detoxificantes

#### *Superóxido dismutasa (SOD)*

La superóxido dismutasa representa la primera línea de defensa de las células frente al estrés oxidativo. Cataliza la conversión de los radicales anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno:  $O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ .

Cualquier célula que utilice el oxígeno tiene el potencial de producir anión superóxido y, por tanto, debe contener alguna forma de superóxido dismutasa (Fridovich, 1974). Las superóxido dismutasas constituyen una familia de metaloenzimas que se clasifican en cuatro grupos según el metal que actúe de cofactor en su centro activo: FeSOD, MnSOD, CuZnSOD y NiSOD (Lynch y Kuramitsu, 2000). En eucariotas existen dos isoformas de SOD: MnSOD (tetramérica mitocondrial) (Fridovich, 1998), y CuZnSOD (dimérica citoplasmática). El ion Zn desempeña un papel estructural y el Cu es importante para la actividad catalítica. Ambos iones metálicos están ligados a un imidazolato importante para la conducción de protones

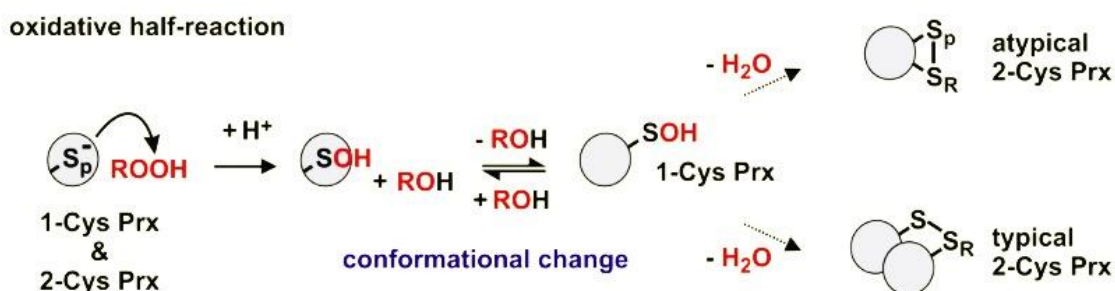
#### *Glutathion peroxidasa (GPxs) y peroxirredoxinas*

Las glutathion peroxidasas y las peroxirredoxinas son enzimas que usan un residuo de cisteína para reducir peróxidos.

Las GPxs tienen una amplia especificidad de sustrato y una mayor afinidad por  $H_2O_2$  que la catalasa. Algunas son específicas para peróxidos presentes en la membrana lipídica (las PHGPx) y están asociados a membranas. (Ursini et al., 1995). La reducción está acoplada al sistema de tioredoxina (Delaunay et al., 2002). Las GPxs clásicas son llamadas también cGPx y usan el sistema glutathion como agente reductor.

Las peroxirredoxinas (Prx) utilizan el residuo de cisteína para reducir peróxidos, peroxinitritos e hidroperóxidos. Se dividen en dos grupos: 1-Cys Prx y 2-

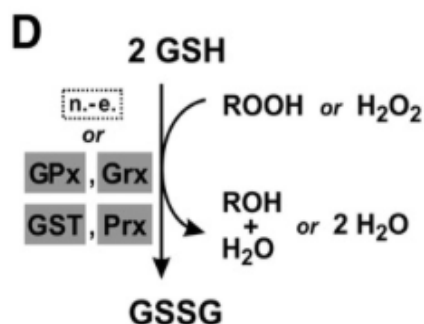
Cys Prx, dependiendo del número de cisteínas implicados en el proceso catalítico (Chae y Rhee, 1994). En comparación a las catalasas y las glutatión peroxidasa, las Prx poseen una baja eficiencia catalítica (Hofmann et al., 2002). Se ha descrito que además de función peroxidasa estas enzimas desempeñan otras funciones celulares, ya que son fácilmente inactivables y eso supondría una ventaja para la célula eucariota que usaría entonces el  $H_2O_2$  como molécula señalizadora (Wood et al., 2003, Georgiou y Masip, 2003).



**Figura I12:** Modelos de catálisis de las Prx. La enzima existe en un equilibrio monómero-dímero y la reacción oxidativa acaba dando como resultado varias especies Prx-ox dependiendo del mecanismo. (Adaptado de Deponte, 2013)

### *Glutathione S-transferasa (GST)*

Las GST son enzimas implicadas en la detoxificación. Son una superfamilia de proteínas multifuncionales. Su actividad primaria es la transferencia y unión de glutatión reducido a compuestos no polares que contienen un átomo de carbono, nitrógeno o azufre electrofílico. Como consecuencia de esta función, contribuyen a la detoxificación o metabolismo de drogas, pesticidas, compuestos xenobióticos y otros productos que causan estrés oxidativo y suelen considerarse como contaminantes ambientales (Hayes et al., 2005; Oakley, 2005). También intervienen en procesos de detoxificación de agentes tóxicos de origen natural, como las toxinas de plantas y hongos filamentosos (Sheehan et al., 2001). Además, algunas pueden tener actividades peroxidasa, isomerasas y tiol transferasas (Board et al., 2000).



**Figura I13:** Modelo del metabolismo del glutatión. La eliminación GSH- dependiente de  $H_2O_2$  y otros hidroperóxidos es catalizada por una variedad de enzimas, incluyendo GPx, Prx, GST y algunas isoformas de Grx. (Adaptado de Deponte,, 2003).

Las GSTs se encuentran ampliamente distribuidas en los seres vivos y están presentes, tanto en organismos pluricelulares, como en microorganismos unicelulares, procariotas y eucariotas. Esta superfamilia se divide en 4 subfamilias distintas según su origen o localización celular: GSTs citosólicas, mitocondriales, microsomales y GSTs FosA (proteínas bacterianas de resistencia a fosfomicina). Las dos primeras, citosólicas y mitocondriales, son las que guardan mayor relación entre sí (Pearson, 2005)

#### *Tioredoxinas*

Las tioredoxinas son una familia de pequeñas proteínas con actividad redox, presentes en todos los organismos. Todas las tioredoxinas poseen en su centro activo la secuencia conservada Cys-Gly-Pro-Cys. Estos dos residuos de Cys son capaces de formar puentes disulfuro y, de esta forma, ceder electrones y reducir una serie de sustratos (Arner y Holmgren, 2000). La reacción es reversible, es decir, la Trx puede romper o formar disulfuros, dependiendo del potencial redox de su sustrato (Koharyova y Kolarova, 2008).

En general, las funciones de las tioredoxinas se pueden separar en dos grandes grupos: por un lado, actúan como cofactores de varias enzimas implicadas en rutas biosintéticas, principalmente de ácidos nucleicos, cediendo electrones. Son ejemplos representativos la ribonucleótido reductasa, metionina sulfóxido reductasa y sulfato reductasa. Por otro lado, actúan como antioxidantes e impidiendo la inactivación o agregación proteica, al formar puentes disulfuro intra o intermoleculares (Arner and Holmgren, 2000). En procariotas se ha descrito una única Trx, mientras que los mamíferos presentan dos Trxs distintas; Trx1 y Trx2. En *Arabidopsis thaliana* se han identificado 20 isoformas distintas, distribuidas entre

citosol, mitocondrias y cloroplastos (Rouhier et al., 2008). Las Trxs son inducidas por múltiples estímulos, incluyendo herbicidas, insecticidas, hipoxia, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otros agentes oxidantes, radiación ultravioleta y radiaciones ionizantes. La expresión de las Trxs depende también de la fase del ciclo celular (Powis y Montfort, 2001).

## **7. Métodos de secuenciación masiva: RNA-seq**

La caracterización completa y el análisis global de la expresión génica en una célula o tejido, aun sin ninguna información genómica previa, es ahora posible a través de la secuenciación masiva de ADNc, o más recientemente de la secuenciación directa de ARN, tecnología conocida como RNA-seq (Wang et al., 2009, Garber et al., 2011, Egan et al., 2012, Ward et al., 2012). Esta herramienta molecular cambia la manera de cómo se analizan y comprenden los transcriptomas (Wang et al., 2009), y es de uso cada vez más extendido en investigación.

El RNA-seq se fundamenta en la secuenciación en masa de ADNc mediante técnicas de última generación. Con este método se obtienen muestras totales de ARN, de los cuales se rescata el ARNm a partir de sus colas poliA, se fragmenta y se convierte en una librería de ADNc. Es un requisito importante de esta metodología que la muestra de ARN obtenida tenga buena calidad y represente todos los transcritos poliadenilados que se producen en la condición y tejido de estudio (Ward et al., 2012). Una vez obtenido el ADNc, se ligan adaptadores de tal forma que cada fragmento generado contendrá un adaptador ligado en sus extremos 5' y 3'. Las secuencias de estos adaptadores se conocen y serán necesarias para secuenciar los fragmentos. No todos los métodos requieren la ligación de adaptadores, lo cual dependerá de la plataforma de secuenciación a emplear. Los adaptadores se pueden ligar directamente a la muestra de ARN, con anterioridad a la síntesis de ADNc (Core et al., 2008).

El estudio y análisis del transcriptoma es esencial para el entendimiento de la función de genes. De manera general se puede afirmar que si un gen se expresa en una condición o célula determinada es porque cumple allí una función. El estudio global del transcriptoma permite también establecer patrones de regulación génica coordinada, y poder conocer la función y agrupamiento de varios genes bajo un

estímulo o condición específica, además de identificar elementos promotores comunes a varios genes.

Dentro de las aplicaciones y ventajas que presenta la tecnología RNA-seq destaca la cobertura completa que proporciona sobre los transcritos, generando información no solo de sus secuencia, sino también de la estructura de exones y posibles eventos de maduración alternativa de intrones (Lister et al., 2009, Gulledge et al., 2012). Asimismo, los datos obtenidos por RNA-seq no solo son cuantitativos y tienen una alta precisión con respecto a los niveles de expresión génica que se obtienen a través de RT-PCR cuantitativa (qPCR) sino que permiten hacer comparaciones de expresión entre genes diferentes (Nagalakshmi et al., 2008, Wang et al., 2009; Ward et al., 2012). Además, también se ha mostrado que los resultados son altamente reproducibles (Wang et al., 2009). Respecto a la metodología de secuenciación masiva a emplear, las lecturas cortas obtenidas con Illumina pueden ser la mejor opción si se cuenta con un genoma referencia, ya que no es necesario ensamblar el transcriptoma completo y el alto número de lecturas que se generan darán mayor fiabilidad a los datos para la cuantificación de la expresión y para otros fines, como la detección de polimorfismos (Ozsolak et al., 2011)

El ensamblaje y análisis de los datos generados por la tecnología RNA-seq requiere competencias en un área de gran empuje en la actualidad, como es el de la bioinformática. Una herramienta habitualmente usada es el programa R, con el que ya ha diseñado un paquete estadístico, denominado DEGseq, dirigido al análisis de la expresión diferencial entre muestras y tratamientos (Wang et al., 2010).

Como ya se ha indicado, la tecnología RNA-seq no solo permite identificar la presencia de transcritos, sino la de cuantificar el nivel de expresión de cada uno, corrigiendo los números de secuencias en relación al tamaño de cada transcrito. En este sentido aquellas lecturas de un gen que se encuentren en alta proporción representarán niveles altos de expresión mientras los transcritos ausentes, o con un bajo número de lecturas, serán aquellos que o no se expresan o lo hacen a niveles muy bajos (Schenk et al., 2012). EN los análisis de las lecturas generadas por RNA-seq es muy frecuente el uso de varios parámetros estadísticos. Uno de ellos es el RPKM (“reads per kilobase of exon per million mapped reads”), empleado para cuantificar niveles de transcritos, y realizar comparaciones entre muestras (Mortazavi et al., 2008). Otro parámetro útil y muy usado es el “fold change” de lecturas, que

corresponde a la relación entre el número de lecturas generadas para un gen particular en una muestra en comparación con otra. Al estimar este parámetro es posible correlacionar la expresión de un gen en dos condiciones distintas, así como establecer *ratios* de expresión génica diferencial entre tratamientos (Auer y Doerge, 2010).

Las aplicaciones de RNA-seq se han llevado a cabo en todos los grupos taxonómicos, habiéndose sido empleadas en organismos tan dispares como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, el ratón y el humano (Nagalakshmi et al., 2008, Mortazavi et al., 2008, Maher et al., 2009, Pickrell et al., 2010, Gan et al., 2010, Daines et al., 2011, Peng et al., 2012), lo que demuestra la alta aplicabilidad de esta técnica. En el capítulo 2 de esta Tesis hemos abordado el estudio del efecto de la luz y del producto del gen *carS* en el transcriptoma de *F. fujikuroi* mediante RNA-seq.



## **II. OBJETIVOS**



## II. OBJETIVOS

Como se ha mencionado en la introducción, se conoce la identidad del gen *carS*, y se sabe que su pérdida de función provoca la desregulación transcripcional de la mayoría de los genes de la síntesis de carotenoides, dando lugar a su sobreacumulación (Rodríguez-Ortiz et al., 2012). Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular por el que esta proteína ejerce su función reguladora sobre los genes de esta ruta, que es estimulada por la luz en la estirpe silvestre. El objetivo general de esta Tesis es profundizar en el conocimiento sobre el mecanismo de acción de la proteína CarS y su relación con la luz en *Fusarium fujikuroi*.

Para ello se ha planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Investigar el mecanismo de acción de la proteína CarS a través del estudio de su ubicación en la célula y la identificación de sus dianas moleculares.
2. Caracterizar su función reguladora mediante el estudio del impacto de la mutación *carS* en el transcriptoma del hongo y relacionarlo con el efecto producido por la luz.
3. Analizar la relación entre el gen *carS* y el control de la carotenogénesis a través del estudio de su propia regulación y su conexión con la regulación de la ruta por luz y por condiciones de estrés en el hongo.



### **III. CAPÍTULO 1**

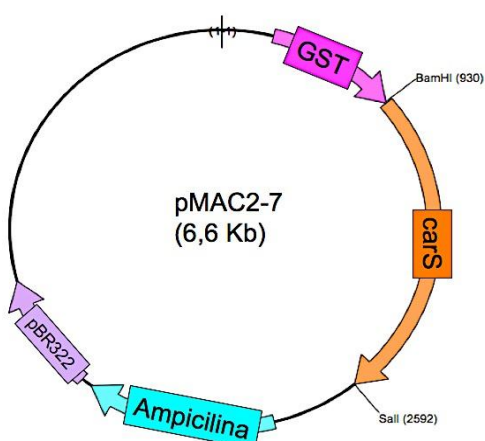


### III. CAPÍTULO 1. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA CarS

#### 1.1. Producción de proteína de fusión GST-CarS

Como primer paso, se abordó la producción heteróloga y purificación de la proteína CarS. Se eligió para ello el sistema de fusión a la Glutación-S-transferasa (GST). Este método permite la purificación proteica por medio de una cromatografía de afinidad, en la que el glutatión se encuentra inmovilizado en una matriz de agarosa. Al pasar el extracto total de proteína por la columna, la proteína de fusión queda unida al ligando, mientras que el resto de los componentes no son retenidos y se eliminan tras el lavado de la columna. Posteriormente, la proteína de interés se eluye con la ayuda de un tampón que contiene glutatión reducido. Una ventaja de este método es que la proteína conserva su estructura, ya que la purificación se realiza en condiciones no desnaturizantes.

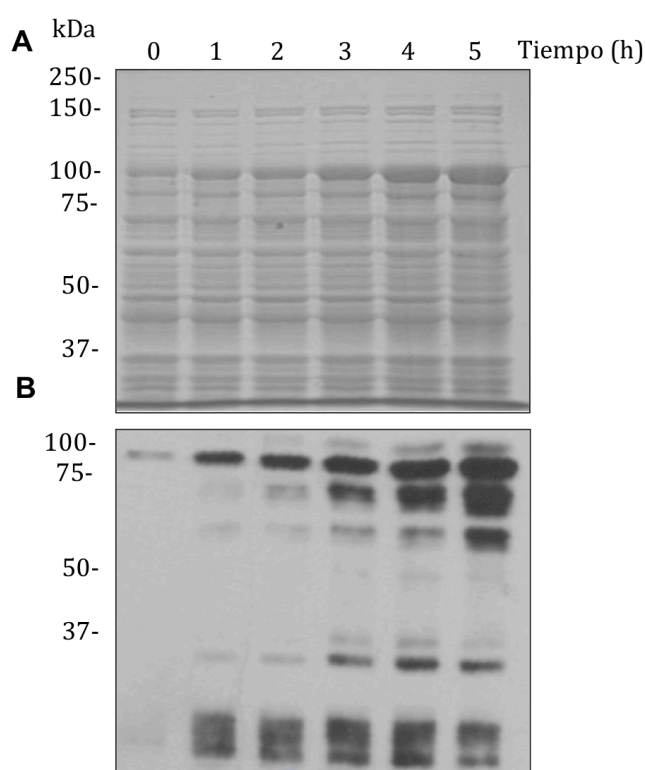
Para la producción heteróloga de CarS, se realizó una fusión del gen *carS* al gen *GST* insertándolo entre las dianas de restricción *Bam*HI y *Sal*I del vector pGEX-4T-3 (Amersham Biosciences), dando como resultado el plásmido pMAC2-7 (Figura 1.1). La disponibilidad de proteína de fusión GST-CarS purificada mediante columna de afinidad permitirá comprobar la eficacia del anticuerpo anti-CarS, y poderlo así emplear con garantías en posteriores ensayos de unión a ADN.



**Figura 1.1:** Mapa del plásmido pMAC2-7. El gen *carS* se clonó en fase con el gen *GST*, que está bajo el control del promotor *Ptac*, usando las dianas *Bam*HI y *Sal*I del vector pGEX-4T-3.

Para optimizar las condiciones de purificación de la proteína GST-CarS se probaron distintos tiempos de inducción de la transcripción mediante adición de IPTG

al cultivo, tras los cuáles las bacterias se sonicaron y el extracto total de proteínas obtenido se visualizó mediante tinción con azul de Coomassie (Figura 1.2A). Posteriormente, se realizó un *western* con el anticuerpo comercial anti-GST y otro con un anticuerpo frente CarS. El anticuerpo frente a un epítopo de la proteína CarS fue escogido por un programa informático por la empresa suministradora del anticuerpo, y que comprende los residuos 250-265 de la proteína. Llamaremos a este anticuerpo Anti-CarS. Se espera que la proteína de fusión tenga un tamaño de unos 95 kDa (68,75 kDa de CarS + 26 kDa de GST).



**Figura 1.2: Producción de GST-CarS en función del tiempo de inducción con IPTG.**

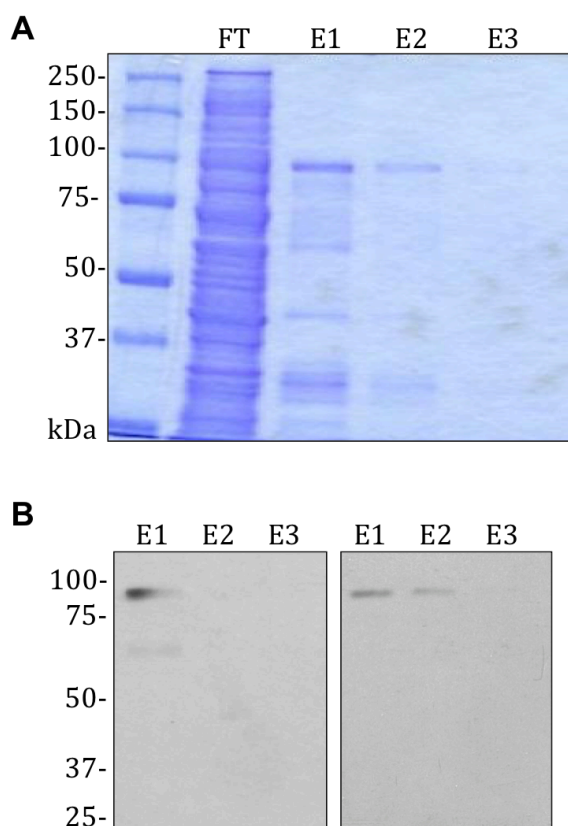
**A.** Extractos totales de *E. coli* B121 inducidos con IPTG durante 0 a 5 h.

**B.** Detección de la proteína GST-CarS con el anticuerpo anti-GST en los extractos totales de proteína inducidos a los mismos tiempos que en la figura A.

Tras examinar los resultados de *western* mostrados en la Fig. 1.2 B se escogió el tiempo de 3 horas de inducción para purificar la proteína, ya que aunque se obtuvo mayor cantidad de proteína de fusión tras 4 y 5 h de inducción, en estos extractos se detectaron mayores cantidades de bandas secundarias, probablemente productos de degradación, lo que haría que se purificaran también dichos productos. A continuación, los distintos eluidos obtenidos en la purificación a partir de la fracción inducida durante 3 h se separaron en una electroforesis de acrilamida y se



visualizaron por tinción con azul de Coomasie (Fig. 1.3A). Para detectar la proteína recombinante se realizó un *western* utilizando los anticuerpos anti-CarS (Figura 1.3 B) y anti-GST (Figura 1.3 C). Los resultados muestran la presencia de una proteína del tamaño esperado, detectada con ambos anticuerpos, en abundancia decreciente en los eluidos 1, 2 y 3.



**Figura 1.3: Purificación de la proteína GST-CarS.**

**A.** Elución con las columnas de afinidad por adición de glutatión de la proteína purificada. FT: fracción no unida a la glutatión sefarosa. E1, E2, E3: los distintos eluidos de la columna con la proteína de fusión.

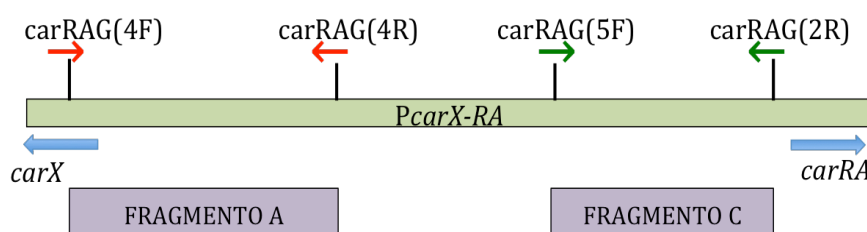
**B.** Detección mediante *western* con el anticuerpo anti-CarS (izquierda) y detección con el anticuerpo anti-GST (derecha).

## 1.2. Ensayos de unión a ADN (EMSA)

Experimentos previos de retraso de bandas mostraron que los extractos de proteína totales de *F. fujikuroi* poseen al menos una proteína capaz de unirse al promotor del gen *carX*, mientras que esa unión no se detectó con extractos equivalentes de un mutantes *carS* (Rodríguez-Ortiz, 2012). Por tanto, la proteína CarS es responsable del retraso en la migración del ADN, bien por su unión directa al segmento de ADN próximo al gen *carX* o bien por hacer posible la unión de otra proteína. Para comprobar si dicho retraso es causado por la unión directa de la

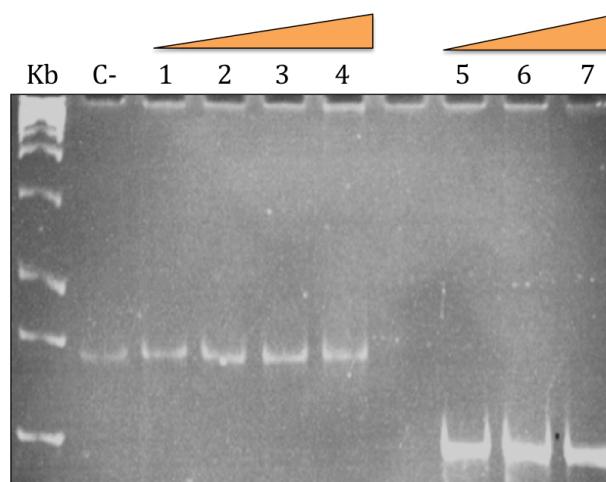
proteína CarS, se llevó a cabo un ensayo de retardo de movilidad (EMSA) con la proteína purificada. En el ensayo se utilizó como ADN diana la región promotora bidireccional de los genes *carRA* y *carX*, que incluye el segmento de ADN que dio positivo en el ensayo arriba citado.

Dado que la región promotora *PcarX-carRA* contiene realmente dos promotores en direcciones opuestas, uno para cada gen, para el ensayo se amplificaron por separado las regiones próximas al gen *carX* (fragmento A) y al gen *carRA* (fragmento C) (Figura 1.4), por considerar que poseen una alta probabilidad de unión de los factores de transcripción responsables de la activación o represión de cada promotor.



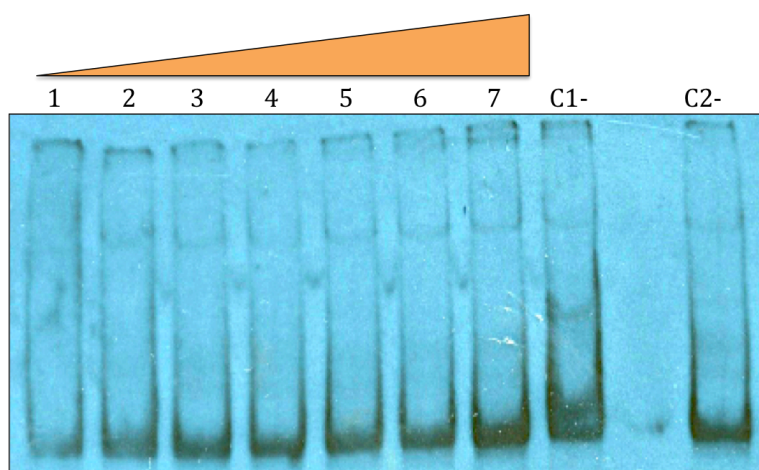
**Figura 1.4. Esquema de la región promotora de los genes *carRA* y *carX*.** Se muestran las posiciones de los cebadores usados para amplificar los fragmentos usados en los ensayos de retardo.

Los ensayos se realizaron incubando GST-CarS con los distintos fragmentos del promotor previamente marcados con digoxigenina. Dichos fragmentos se separaron en geles de agarosa o acrilamida, los cuales se tiñeron posteriormente con bromuro de etidio. En el primer ensayo realizado se incubaron los fragmentos A y C con concentraciones crecientes de proteína GST-CarS, se separaron mediante electroforesis en agarosa y no se detectó en ningún caso retraso en la migración de las bandas (Fig. 1.5).



**Figura 1.5. Ensayo de retraso de los fragmentos A y C de la región promotora *PcarX-carRA*.** La visualización se realizó exponiendo a radiación UV el gel teñido con BrEt. Kb: Marcador de tamaño; C- y carriles 1-5: fragmento A del promotor *carRA/carX*. Se usaron concentraciones crecientes de proteína GST-CarS (1: 3 µg; 2: 6 µg; 3: 12 µg; 4: 24 µg). Carriles 5-7: fragmento C del promotor *carRA/carX*. Se usaron dos concentraciones de proteína GST-CarS (6: 12 µg; 7: 24 µg).

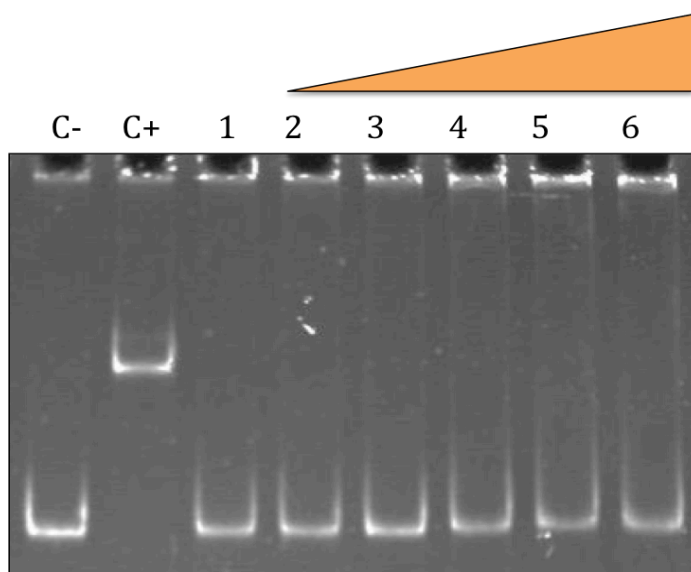
En un segundo ensayo se centró la atención en el fragmento A, por ser el que dio resultados positivos con extractos celulares completos (Rodríguez-Ortiz, 2012). Se marcó dicho fragmento con digoxigenina y se incubó con cantidades crecientes de GST-CarS, en este caso a concentraciones más elevadas que en el ensayo anterior. La separación se hizo en un gel de acrilamida. De nuevo, no se pudo apreciar ningún retraso significativo en la migración de la banda (Fig. 1.6).



**Figura 1.6. Ensayo de retraso del fragmento A de la región promotora *PcarX-carRA*.** La visualización se hizo mediante detección con el anticuerpo anti-DIG. Se usaron 20 ng de fragmento del promotor con concentraciones crecientes de GST-CarS (1: 0,06 µg, 2: 0,12 µg, 3: 0,25 µg, 4: 0,75 µg, 5: 1 µg, 6: 2 µg, 7: 3 µg). C1-: Control de promotor sin proteína, C2-: 0,06 ug GST purificada.

Dado que los resultados obtenidos en los ensayos de unión de GST-CarS a la región promotora *PcarX-carRA* han sido negativos, no se puede descartar la posibilidad de algún fallo experimental. Desgraciadamente, no se dispone de un control positivo de unión a dicha región de ADN. Por ello, para comprobar la eficacia del método experimental, se realizó un nuevo ensayo, incluyendo en esta ocasión en paralelo una proteína y fragmento de ADN para el cual se ha demostrado anteriormente la existencia de interacción, como es el caso de la proteína MadA de *P. blakesleanus* y el promotor del gen *hspA* del mismo organismo (A. Miralles-Durán, comunicación personal).

En este nuevo ensayo se puede observar cómo, efectivamente, en presencia de proteína MadA se produce el retraso del fragmento del promotor del gen *hspA* (comparar C+ con control negativo C- en la, Figura 1.7). Sin embargo, en las mismas condiciones, la adición de cantidades crecientes de proteína GST-CarS al fragmento A, utilizando concentraciones mayores de proteína que las empleadas en los experimentos anteriores, no dio lugar a ningún retraso detectable de la banda (Fig. 1.7). Aunque se trata aún de un resultado negativo, la eficacia del método mostrada por el retraso de la banda MadA-*PhspA* sugiere fuertemente que CarS no es capaz de unirse al fragmento de ADN ensayado. Cabe aún argumentar, sin embargo, que la presencia de la fusión GST puede afectar a la capacidad de CarS de unirse al ADN, o también puede ocurrir que el supuesto sitio de unión, si esta existe, no se encuentre en los segmentos de ADN ensayados, por lo que el resultado negativo debe ser interpretado con la debida precaución.

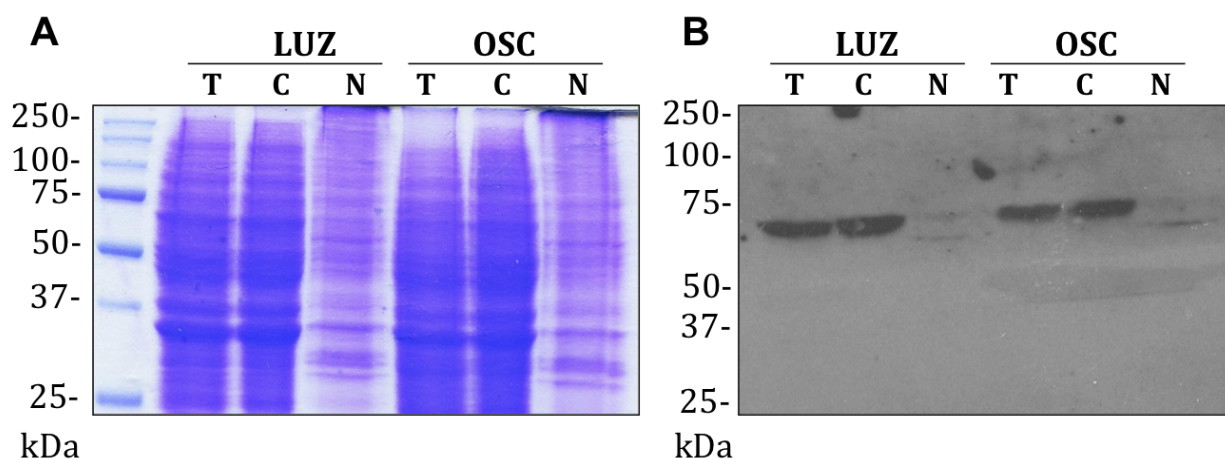


**Figura 1.7: Ensayo de retraso del fragmento A de la región promotora *PcarX-carRA* y control positivo de unión MadA.** C-: Promotor *hspA*; C+: Promotor *hspA* con 5 ng de MadA. En el ensayo de Gst-CarS (carriles 1-6) se emplearon 20 ng de fragmento A (300 pb) de la región promotora *PcarX/carRA* con cantidades crecientes de proteína GST-CarS. 1: ADN sin proteína del fragmento A del promotor. 2: 1,25 µg de GST-CarS; 3: 2,5 µg de GST-CarS; 4: 5 µg de GST-CarS; 5: 10 µg de GST-CarS; 6: 12 µg de GST-CarS. La muestra de proteína MadA purificada fue amablemente cedida por A. Miralles-Durán.

### 1.3. Localización subcelular de CarS

Un aspecto especialmente relevante respecto a la función de la proteína CarS, ya sea la de interaccionar con dianas específicas de ADN o con proteínas, es su ubicación en la célula. Para obtener información a este respecto, se realizó un fraccionamiento celular de la estirpe silvestre en un gradiente de sacarosa. Para ello se cultivó micelio en medio DG líquido en oscuridad durante tres días en dos cultivos paralelos y uno de ellos se iluminó al final de la incubación durante una hora con luz blanca. Los micelios obtenidos se filtraron, se enfriaron en nitrógeno líquido en un mortero, se trituraron y se homogeneizaron en un tampón. Tras sucesivas centrifugaciones en distintos gradientes de sacarosa (ver materiales y métodos), se aislaron las fracciones nuclear y citoplasmática. Finalmente, las fracciones obtenidas se emplearon para hacer experimentos de *western* con anti-CarS. Tras la electroforesis de las distintas fracciones, se tiñó el gel con azul de Coomassie. Como resultado (Fig.

1.8), se obtuvieron patrones muy diferentes de proteínas en las fracciones nuclear y citoplasmática. Además, la fracción citoplasmática fue muy similar a la muestra total, previa al fraccionamiento, como cabe esperar al ser mayoritario el componente citoplasmático en la célula. Los patrones de proteína obtenidos sugieren que las fracciones se separaron correctamente.



**Figura 1.8: Detección de CarS en las fracciones citoplasmática y nuclear de *F. fujikuroi*.** **A.** Electroforesis del fraccionamiento celular en oscuridad o tras una hora de iluminación. T: Fracción total, C: Fracción citoplasmática, N: Fracción nuclear. **B.** Western con anti-CarS de un fraccionamiento similar al que se muestran en A. Gel de acrilamida al 10%.

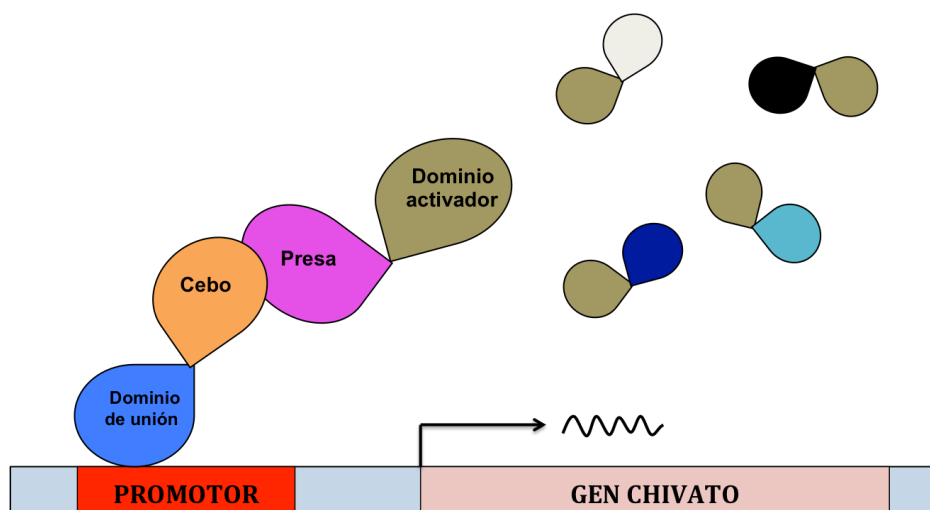
El revelado del *western* tras el tratamiento con el anticuerpo Anti-CarS detectó la proteína CarS tanto en la fracción citoplasmática como en el extracto total, pero prácticamente no se detectó en la fracción nuclear (Figura 1.8 B). Por otro lado, la iluminación durante una hora no produjo ningún efecto en la localización de la proteína. La detección de CarS en la fracción citoplasmática es consistente con una función de CarS como proteína reguladora que lleva a cabo su acción interaccionando con otras proteínas en el citoplasma.

#### 1.4. Búsqueda de interacciones mediante la técnica del doble híbrido

Puesto que tanto datos anteriores con la proteína CrgA en *M. circinelloides* como los indicios descritos hasta ahora en este capítulo con CarS sugieren que estas proteínas ejercen su función interactuando con otras proteínas, se decidió abordar la búsqueda de dianas de interacción de CarS mediante la técnica del doble híbrido.

El sistema del doble híbrido se basa en que muchos factores de transcripción son modulares, presentando al menos dos dominios claramente diferenciados: el dominio de unión a ADN ("binding domain" o BD) y el dominio de activación de la transcripción ("activation domain" o AD). Esta circunstancia ha sido explotada para el desarrollo de métodos que separan los dominios BD y AD en polipéptidos independientes fusionados a otras proteínas de interés, permitiendo detectar la existencia de interacción proteína-proteína *in vivo* mediante la recuperación de la función activadora. En concreto, el método se basa en la fusión de los dominios BD y AD del activador GAL4 de *S. cerevisiae* a proteínas concretas o a proteínas aleatorias derivadas de genotecas de ADNc. La interacción entre las proteínas objeto de estudio restaura la función activadora del factor de transcripción, detectable gracias a la expresión de un gen chivato adecuado.

En este caso, el sistema del doble híbrido se utilizó para estudiar la posible interacción de CarS con una proteína determinada, y para buscar posible dianas de interacción en una genoteca de ADNc. Las fusiones realizadas con ADNc del gen *carS* con dominios AD o BD de GAL4 para su utilización como proteína "cebo" se describen en la Figura 1. 9. En otro vector se clonó el gen objeto de estudio, fusionado de forma recíproca a los dominios AD o BD de GAL4 o las secuencias aleatorias de ADNc a analizar, en este caso fusionadas al dominio AD de GAL4, dando lugar a la(s) proteína(s) "presa". En la Figura 1.8 se muestra un esquema de la base experimental del procedimiento. Si hay interacción entre CarS y la proteína "presa", el dominio de unión al ADN de GAL4 fusionado a CarS queda unido al dominio de activación de GAL4 formando una proteína heterodimérica, permitiendo la activación de la transcripción del gen chivato en la cepa de *S. cerevisiae* usada en este estudio.



**Figura 1.9. Sistema del doble híbrido.** Cuando las proteínas “cebo” y “presa” interaccionan hacen posible la asociación de los dominios AD y BD en una proteína heterodimérica. Al unirse el dominio BD de este heterodímero al promotor del gen chivato, el dominio AD es capaz de facilitar el inicio de su transcripción, dando lugar a un cambio fenotípico en la célula detectable externamente. Si por el contrario no interaccionan, no se da la transcripción del gen chivato.

Para el análisis del doble híbrido se han utilizado las estirpes YH2Gold y Y187 de *S. cerevisiae*, que tienen delecionado el gen *GAL4* y que además tienen mutaciones en los genes *TRP1* y *LEU2*. Estas auxotrofías se complementan en presencia de los plásmidos pGBT10 o derivados, que llevan el marcador *TRP1*, y pGADT7 o derivados, que tienen el marcador *LEU2*. La estirpe YH2Gold posee además cuatro marcadores que, aunque están controlados por promotores diferentes, responden al factor de transcripción GAL4. Por lo tanto, dichos marcadores sólo se expresarán cuando la proteína CarS interaccione con la proteína “cebo”, y acerque por tanto los dominios de activación y de unión al ADN del activador GAL4. Dos de estos marcadores son los genes *HIS3* y *ADE2*, que permiten el crecimiento de YH2Gold en medio carente de histidina y adenina. El tercer marcador regulado por GAL4 es *AUR1-C*, presente solo en Y2HGold, codifica para la enzima inositol fosforil ceramida sintasa y confiere resistencia a aureobasidina A. El cuarto marcador dependiente de GAL4, en este caso presente tanto en Y187 como en Y2HGold, es *MEL1*, que desempeña un papel especialmente relevante en el escrutinio. MEL1 es una  $\alpha$ -galactosidasa que degrada melibiosa, pero que es capaz también de degradar X- $\alpha$ -Gal para producir un compuesto azul. De esta forma, si estas levaduras se encuentran en presencia de X- $\alpha$ -



Gal y poseen la capacidad de activar los promotores dependientes de GAL4, sus colonias presentan una coloración azulada, permitiendo su detección visual.

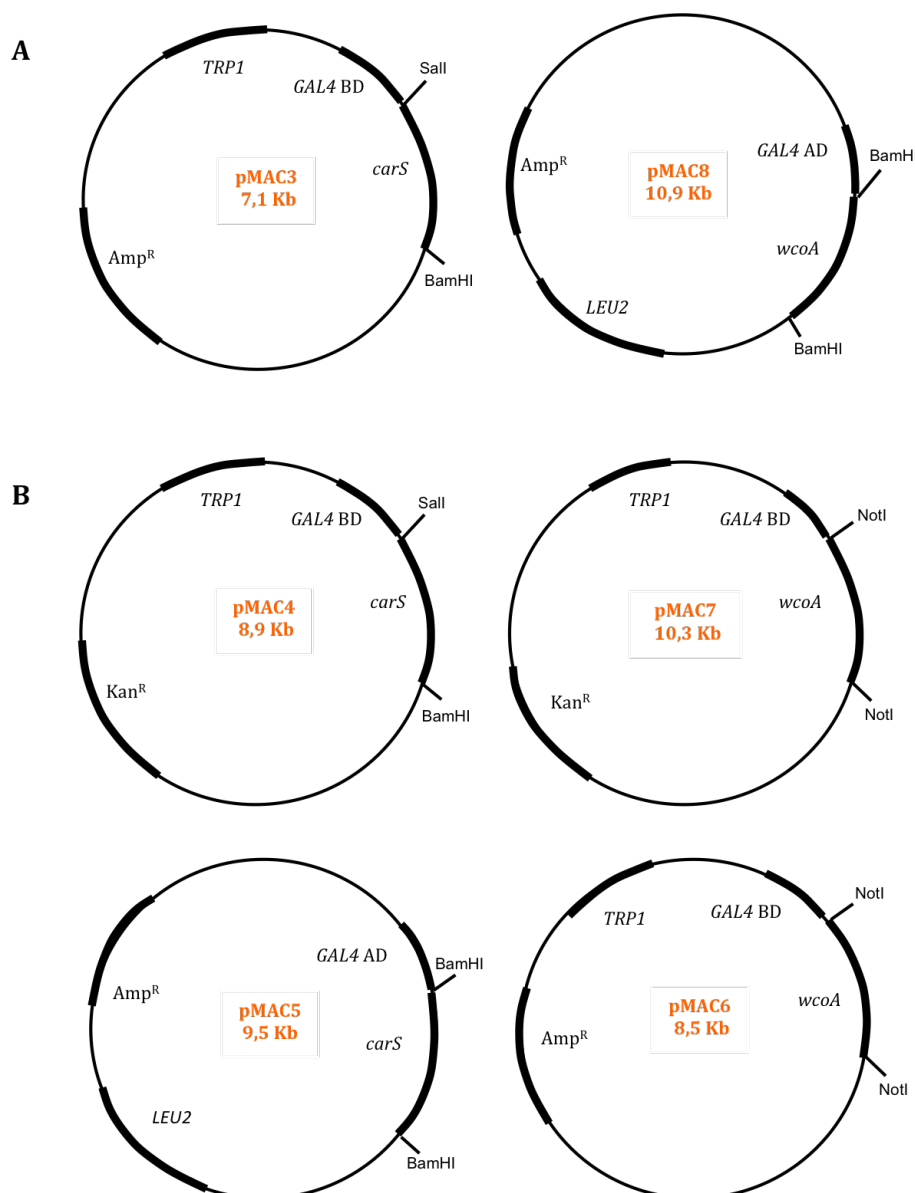


**Figura 1.10. Marcadores de las cepas de levadura Y2HGold e Y187.** En Y2HGold, los marcadores *HIS3*, *ADE2*, *MEL1* y *AUR1-C* se encuentran bajo el control de tres promotores diferentes: G1, G2 y M1, todos con al menos un sitio de unión para el factor de transcripción GAL4 (Adaptado de Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual, Clontech®).

Las estirpes Y187 y Y2HGold son de sexo opuesto, lo que permite reunir en un diploide sus informaciones genéticas por conjugación y comprobar así, si existe interacción entre las proteínas candidatas y la proteína CarS, reconstituyendo la actividad de GAL4. Gracias a las diferentes auxotrofías de cada estirpe es posible la selección de los clones en los que ocurra interacción con la proteína CarS.

#### 1.4.1 Obtención de estirpes para el doble híbrido y controles previos

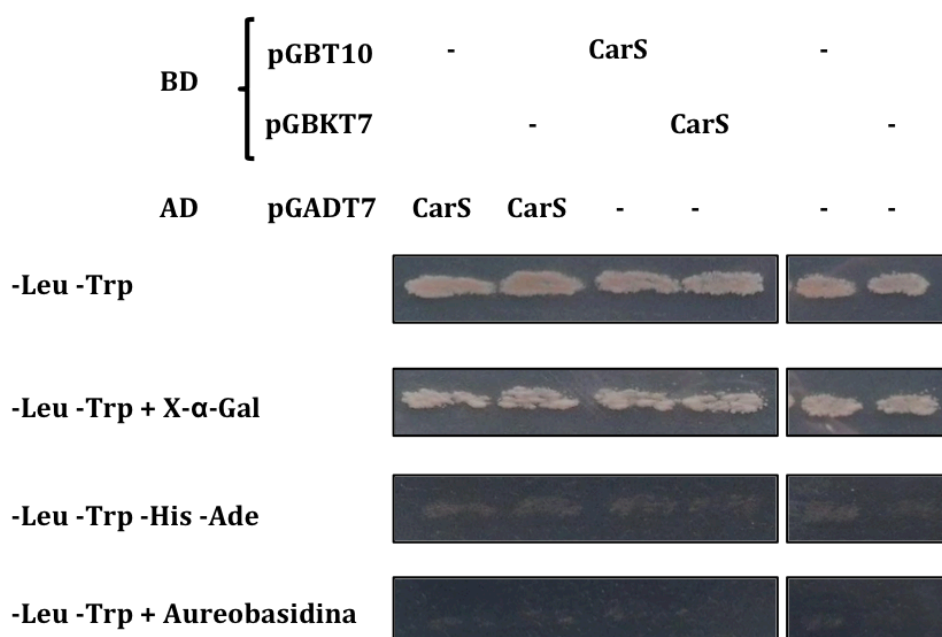
El plásmido pMAC3, que contiene el ADNc del gen *carS* fusionado en fase al dominio de unión de ADN de GAL4 (Figura 1.11), se introdujo por transformación en la estirpe Y2HGold de *S. cerevisiae* (ClonTech), dando lugar a la estirpe productora de la proteína CarS “cebo” fusionada al dominio de unión al ADN del factor de Gal4 (DNA-BD-CarS).



**Figura 1.11. Plásmidos con los genes *carS* y *wcoA* fusionados a los distintos dominios del activador GAL4.** A. pMAC3, donde *carS* está fusionado al dominio de unión a ADN de *GAL4* en el vector pGBT10 y pMAC8, donde *wcoA* está fusionado al dominio de activación de *GAL4* (AD) en el vector pGADT7. B. También se realizaron las construcciones contrarias, fusionando el dominio de activación de *GAL4* a *carS* y el de unión de ADN de *GAL4* a *wcoA*, y usando el vector pGBKT7, el cual contenía el dominio de unión a ADN (BD).

Como requisito experimental previo se comprobó que la proteína CarS no es capaz por sí misma de activar los genes regulados por GAL4. Para ello se obtuvieron diploides por conjugación entre la estirpe con el plásmido pGADT7 vacío y la estirpe que lleva el gen *carS* fusionado al dominio BD (pMAC3, Fig. 1.11), así como con una

estirpe con el plásmido control pGBKT7. Los diploides resultantes se sembraron en medio SD carente de leucina y triptófano. Trp. De acuerdo con los resultados (Fig. 1.12), la ausencia de color azul en presencia de X- $\alpha$ -gal mostró que ni CarS ni los vectores vacíos provocan activación. De igual modo no se observó crecimiento de diploides en los medios carentes de histidina y adenina, lo que confirma que los genes responsable de la síntesis de dichos aminoácidos no se activaron. Tampoco se observó crecimiento en presencia de aureobasidina.



**Figura 1.12: Controles previos del ensayo de doble híbrido.** Se muestra el crecimiento de diploides obtenidos por conjugación entre las estirpes conteniendo los plásmidos con *carS* fusionado a los dominios AD y BD indicados en la parte superior, incubados en las condiciones de cultivo detalladas a la izquierda.

#### 1.4.2. Análisis de una posible interacción entre CarS y WcoA

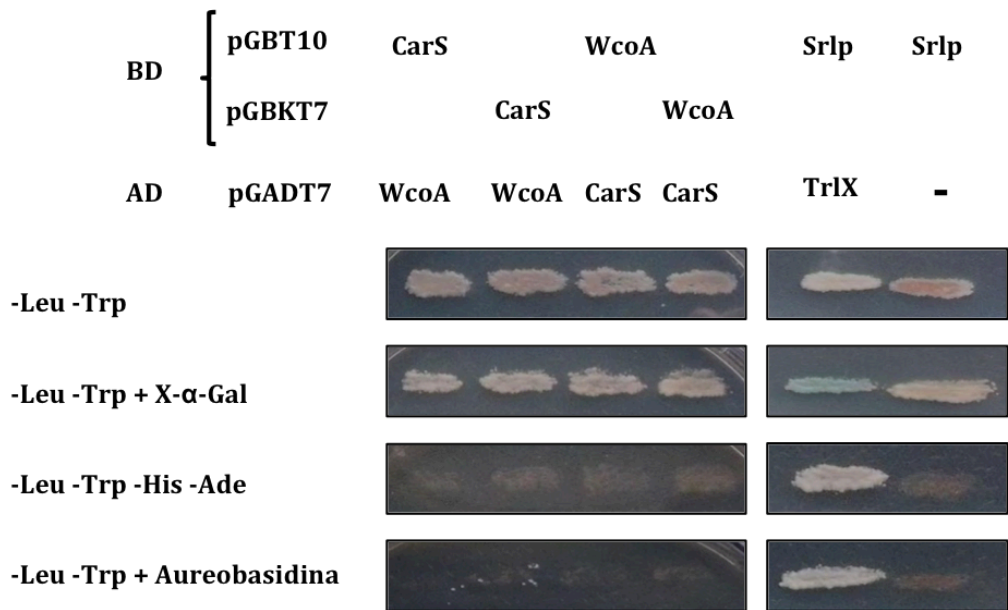
Puesto que se postula que CrgA y CarS pueden tener mecanismos similares de acción, y dado que en el caso de CrgA de *M. circinelloides* se ha demostrado experimentalmente que inactiva una de sus proteínas de tipo White Collar 1, MCWC-1, se decidió investigar si CarS es capaz de interaccionar con WcoA, la única proteína de este tipo en el genoma de *F. fujikuroi*. De hecho, en *M. circinelloides* la inactivación de MCWC-1 se lleva a cabo mediante su ubiquitinación a través de la actividad ligasa de

ubiquitina de CrgA. Sin embargo, no fue posible demostrar la interacción directa entre ambas proteínas debido a la dificultad de purificar CrgA en *E. coli* (Silva et al., 2008).

Para ensayar la posible interacción de CarS y WcoA de *F. fujikuroi*, sus secuencias de ADNc se fusionaron a los dominios de unión a ADN y de activación de *GAL4* en las dos combinaciones posibles (Figura 1.9). Así, pMAC3 y pMAC4 contienen el gen *carS* fusionado al dominio de unión a ADN (BD) con distintos marcadores de selección bacteriana, mientras que en pMAC5 está fusionado al dominio activador (AD). Por su parte, pMAC6 y pMAC7 contienen WcoA fusionado al dominio BD (también con distintos marcadores de selección bacteriana) y pMAC8 contiene WcoA fusionado al dominio AD.

Las estirpes YH2Gold e Y187 se transformaron con los diferentes plásmidos, y se obtuvieron los correspondientes diploides por conjugación. En ninguna de las combinaciones realizadas se detectó interacción entre CarS y WcoA, ya que no se observó crecimiento en ninguno de los medios de selección. Como control positivo se usó la interacción entre Slrp y Trx1, descrita anteriormente (Bernal-Bayard et al., 2009). Para ello se usaron construcciones con la proteína Slrp fusionada al dominio de unión y Trx1 fusionada al dominio de activación, y se conjugaron las mismas estirpes de *S. cerevisiae*. El crecimiento del conjugante con ambas construcciones (C+) en relación al control (C-) demuestra la existencia de interacción.

Como es habitual en los experimentos de doble híbrido, la no interacción de CarS y WcoA resultante del experimento no debe tomarse como un resultado concluyente, ya que las proteínas no se encuentran en su estado nativo. Es posible que las fusiones impidan que se lleve a cabo una interacción que se esté produciendo *in vivo* entre las proteínas silvestres. Además, es posible que la interacción requiera algún tipo de modificación postraducciona de alguna de las dos proteínas, que no se produzca en un contexto celular extraño, como es el de *S. cerevisiae*.



**Figura 1.13. Ensayo de interacción entre CarS y WcoA.** Se obtuvieron diploides entre estirpes con las distintas combinaciones de los dominios de unión y activación unidos a los dos genes, según se indica en la parte superior del esquema. El crecimiento y la coloración se visualizó mediante parches de conjugación en los distintos medios suplementados, cuyas composiciones relevantes se detallan a la izquierda. C+ corresponde al control positivo de interacción entre las proteínas Srlp y Trx1 y C- su control negativo. Las levaduras con las correspondientes construcciones fueron amablemente proporcionadas por el Dr. F. Ramos Morales.

### 1.5. Escrutinio de proteínas capaces de interaccionar con CarS

Tras la ausencia de resultado positivo en el ensayo de interacción entre CarS y WcoA, se procedió a realizar un escrutinio completo mediante la técnica del doble híbrido de posibles dianas de interacción de CarS en el proteoma de *F. fujikuroi*. Para ello se construyó una genoteca de expresión de ADNc en *S. cerevisiae* mediante el kit comercial “Make your own ‘Mate and Plate’™”, de Clontech.

#### 1.5.1. Construcción de la genoteca para el ensayo del doble híbrido

El ADNc se sintetizó a partir de ARNm extraído de micelio cultivado en oscuridad, condiciones en la que la síntesis de carotenoides se encuentra básicamente reprimida. Esta elección se basó en la hipótesis de que al ser CarS un regulador negativo de la carotenogénesis, cabe suponer que en estas condiciones se esté expresando o bien una proteína represora activada por CarS, o bien una proteína activadora reprimida por CarS. De acuerdo con esta hipótesis, en condiciones de

iluminación CarS dejaría de ejercer su función negativa, permitiendo que los genes de la carotenogénesis se expresen.

La genoteca se obtuvo por recombinación homóloga transformando la cepa Y187 con el *pool* de ADNc y pGADT7-Rec, dando lugar aproximadamente a  $2,2 \times 10^7$  clones independientes. Como control positivo se usó el fragmento SV40 Large-T, el cual es capaz de activar GAL4.

### 1.5.2. Conjugación y escrutinio de diploides

Para el escrutinio, se introdujo en la estirpe YH2Gold el plásmido pMAC3, que lleva el gen *carS* fusionado al dominio BD (Fig. 1.9), y se cultivó en medio de cultivo carente de triptófano. El cultivo obtenido se concentró y se mezcló con 0,5 ml de del cultivo generado en la construcción de la genoteca, incubado la mezcla en agitación a baja velocidad para favorecer la formación de diploides. La conjugación se comprobó al microscopio óptico y se detuvo cuando se hizo visible en la mezcla un número suficientemente elevado de conjugantes. En ese momento, las células se lavaron y se sembraron en medio selectivo para los diploides (SD –Trp –Leu –His).

El porcentaje de diploides formados se estimó mediante la realización de diluciones seriadas. Las siembras se realizaron en diferentes medios, de forma que se pudo calcular el número de levaduras haploides procedentes de la estirpe con el gen *carS* y con las derivadas de la genoteca, así como el número de diploides (Tabla 1.1). Como se puede apreciar, los clones expresando el gen *carS* se encontraron en exceso en la mezcla, y aproximadamente un 44 % de los clones de la genoteca realizaron conjugación.

**Tabla 1.1. Números estimados de clones haploides derivados del transformante con el gen *carS* y con clones de la genoteca, así como diploides procedentes de la conjugación de ambos tipos de estirpes.**

cepa/plásmido correspondiente	Medio	Nº colonias
Y2HGold/pMAC3 (pGBT10:: <i>carS</i> )	SD –Trp	~ 504.000
Y187/(pGADT7::genoteca)	SD –Leu	~ 11.920
Diploides/(pMAC3 +pGADT7::genoteca)	SD –Trp –Leu	~ 9.300

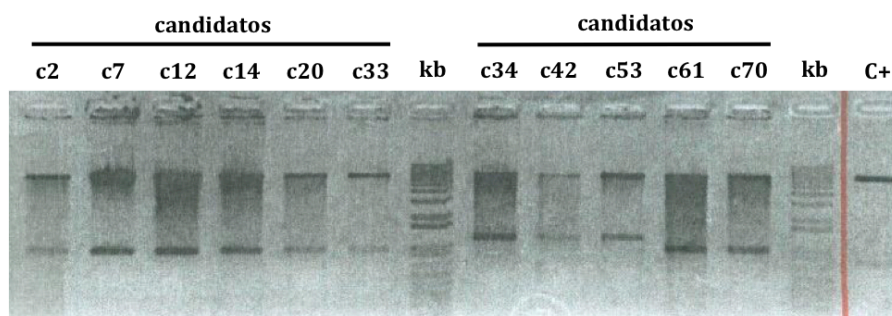
Para el escrutinio, se sembraron unos 200 µl de la mezcla conjugante por cada caja de Petri, lo que corresponde a aproximadamente  $9,3 \times 10^5$  diploides viables, entendiendo como tales aquellos capaces de formar colonias. A fin de seleccionar diploides en los que se expresan los marcadores inducidos por GAL4, se hicieron réplicas con terciopelo a los siguientes medios de cultivo (los signos menos indica la ausencia del correspondiente requerimiento):

1. Medio SD –Leu –Trp, para seleccionar los diploides que llevan los dos plásmidos con los marcadores *LEU* y *TRP*.
2. Medio SD –Leu –Trp – His, para seleccionar el marcador *HIS* inducido por GAL4
3. Medio SD –Leu –Trp – His –Ade, para seleccionar los marcadores *HIS* y *ADE*.
4. Medio SD –Leu –Trp – His –Ade + x-α-Gal, para seleccionar los marcadores *HIS* y *ADE* y *MEL1*.

Se seleccionaron como candidatos a interacción con CarS aquellos diploides que crecieron en todos los medios y además mostraron coloración azul. Se obtuvieron 71 candidatos, que se purificaron para asegurar la conservación tanto del plásmido con el gen *carS* como del plásmido de la genoteca con el clon responsable de la interacción. Se hicieron varios pasos de selección, ya que en muchos casos durante la purificación segregaron tanto colonias azules como blancas.

### 1.5.3 Caracterización de los plásmidos derivados de pGADT7 en los clones positivos

A fin de caracterizar los clones, se aisló ADN plasmídico de los 71 candidatos que crecieron en medio carente de adenina e histidina y se usó para transformar la estirpe HB101 de *E. coli*, auxótrofa para leucina. Se seleccionaron las bacterias transformadas resistentes a ampicilina y protótrofas para Leu, que debían llevar por tanto los plásmidos de la genoteca derivados de pGADT7. Para comprobar si las colonias obtenidas contienen un vector con inserto, se realizaron escrutinios por PCR con los cebadores 3'AD y T7. Por otro lado, se extrajo ADN plasmídico de estas colonias y se dirigieron las muestras con la enzima *HindIII*. La electroforesis de los productos de digestión mostró la presencia de inserto en todos los plásmidos, cuyos tamaños difirieron en algunos clones (Figura 1. 12).



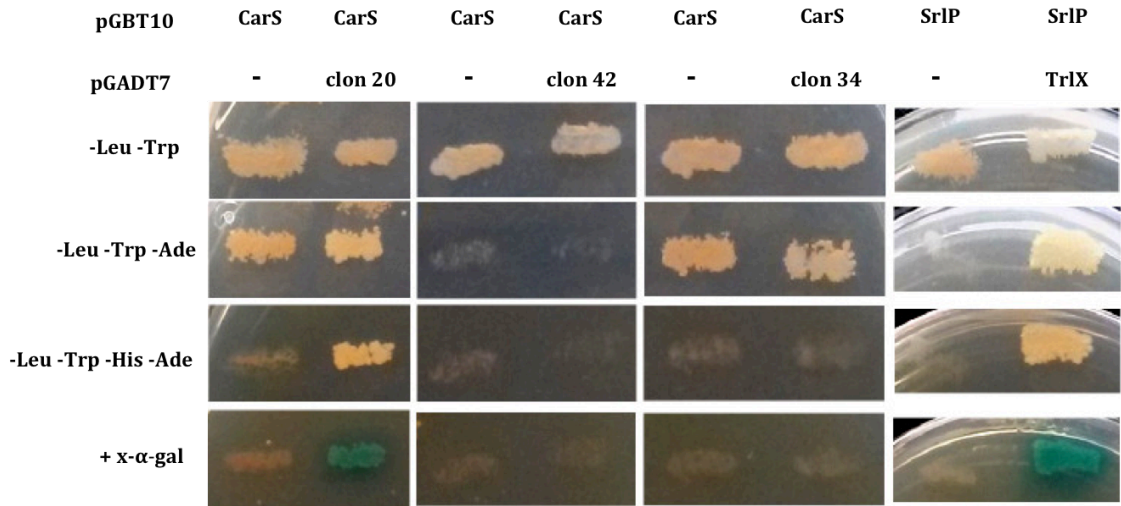
**Figura 1.14 Análisis de algunos de los clones positivos mediante restricción.** La banda superior corresponde al vector, y la banda inferior al inserto. (C: Control de plásmido pGADT7).

#### 1.5.4 Comprobación de la interacción entre los clones obtenidos y la proteína CarS

Los clones positivos de la genoteca podrían haber contenido más de un plásmido; por otro lado, el ensayo de doble híbrido es propenso a la generación de falsos positivos. Por tanto, como un paso de control adicional, los plásmidos obtenidos se introdujeron individualmente en la estirpe Y187 y se ensayó nuevamente su posible interacción con CarS. Para ello, se realizó una conjugación en medio sólido entre la estirpe Y187 transformada con cada plásmido y la estirpe YH2Gold con el plásmido pMAC3 (pGBT10::GB::*carS*). Una vez llevada a cabo la conjugación, los parches se replicaron a medio con distintos requerimientos para comprobar la existencia de interacción en los diploides generados mediante la expresión de los correspondientes marcadores. Por último se replicaron a medio con X- $\alpha$ -Gal para comprobar mediante coloración azul la inducción por Gal4 del marcador *MEL1* (ver 3 clones de ejemplo en la Fig. 1.15).

Solo 23 de los clones analizados conservaron un cierto grado de coloración azul, normalmente débil, manteniendo su capacidad para crecer en ausencia de adenina e histidina. De ellos se secuenciaron 14, rechazándose los demás por presentar un patrón de amplificación con oligos universales igual a los elegidos. Uno de ellos, el clon nº 20 (conteniendo un fragmento del gen *cwhA*, ver sección 1.7), destacó sobre los demás por mostrar un fuerte grado de coloración en comparación con la coloración más débil mostrada por el resto.





**Figura 1.15. Crecimiento de diploides tras la conjugación.** Los candidatos obtenidos en el escrutinio fueron comprobados en los distintos medios. Como control positivo se usó de nuevo la interacción entre SrlP y Trx1. Sólo el clon 20 (*cwhA*) cumplía los requisitos de crecimiento, observándose crecimiento en los medios no suplementados con adenina e histidina y mostrando una coloración azul cuando era crecido en presencia de x-α-gal.

1.6. Identidad de los candidatos positivos

Los clones confirmados en el apartado anterior fueron secuenciados usando los cebadores 3'AD y T7. El tamaño de los clones fue relativamente pequeño, oscilando entre los 100 y 500 pb. Los resultados indicaron que varios de ellos contienen segmentos muy similares del mismo gen, distribuidos en un total de 4 genes cuyas posibles funciones se detallan en la Tabla 1.2. El hecho de que un mismo gen se haya obtenido varias veces es un indicio de saturación en el escrutinio. En los casos de las repeticiones, la secuenciación indicó pequeñas variaciones en los extremos de las secuencias, indicando que se trata de clones independientes. En los tres casos considerados, la región secuenciada se encuentra en el extremo carboxilo de la proteína (Fig. 1.16).

**Tabla 1.2. Clones identificados en el escrutinio de la genoteca mediante el método del doble híbrido**

Proteína	Gen	Código de proteína	Nº de clones
Arginil ARNt sintetasa	FFUJ_03433	CCT66741.1	5
Homóloga al sensor/ transportador Cwh43p	FFUJ_13263	CCT67080.1	4
Proteína con dedo de Zinc	FFUJ_03890	CCT64851.1	3
$\beta$ -glucosidasa homóloga a Cel3C	FFUJ_00469	CCT62926.1	1

El más abundante corresponde a una aminoacil-ARNt sintetasa (aa-ARNtS), en concreto la arginil ARNt sintetasa. Las aa-ARNtS catalizan la esterificación de un aminoácido a la adenosina 3' terminal de un ARNt. Existen 20 aa-ARNtS en la célula, cada una específica de un aminoácido distinto y distribuidas en dos familias estructurales (Eriani et al., 1990), además de un juego de aa-ARNtS para los ARNt mitocondriales. La aminoacilación de los ARNt constituyen una reacción clave para el funcionamiento celular, ya que la disponibilidad de ARNts adecuadamente cargados es esencial para la traducción de todas las proteínas. La posible relación entre CarS y una aa-ARNtS podría interpretarse como un posible punto de control de la función de CarS en función del estado de disponibilidad de nutrientes de la célula. Este hecho puede estar relacionado con la regulación por nitrógeno de *carS*, que se trata en el capítulo 3. De hecho, la aa-ARNtS. ArgRS de *S. cerevisiae* puede sufrir modificaciones post-transcripcionales (Ebel et al, 1973, Gangloff et al, 1973), y no se descarta la posibilidad de que pueda ser diana de ubiquitinación por CarS.



**Figura 1.16. Localización de clones positivos del doble híbrido dentro de las proteínas completas.** En verde se representa el tamaño de la proteína que se corresponde con cada clon. En turquesa se representa el péptido hipotético que se traduciría a partir de los ADNc de los clones obtenidos mediante el doble híbrido.

Le sigue en abundancia el gen homólogo a *CWH43* de *S. cerevisiae*, descubierto a partir de mutantes sensibles a calcofluor White (Martin-Yken et al 2001; Ram et al. 1994; Ram et al. 1995), un compuesto utilizado para teñir las paredes de los hongos. El calcofluor se une a la quitina e impide la polimerización de los componentes de la pared celular. Los mutantes *CWH43* están gravemente afectados en la pared celular. Al gen homólogo al *CWH43* de *S. cerevisiae* en *F. fujikuroi* lo llamaremos *cwhA*. La proteína predicha CWHa tiene características de considerable interés, que se tratan en detalle en la Discusión

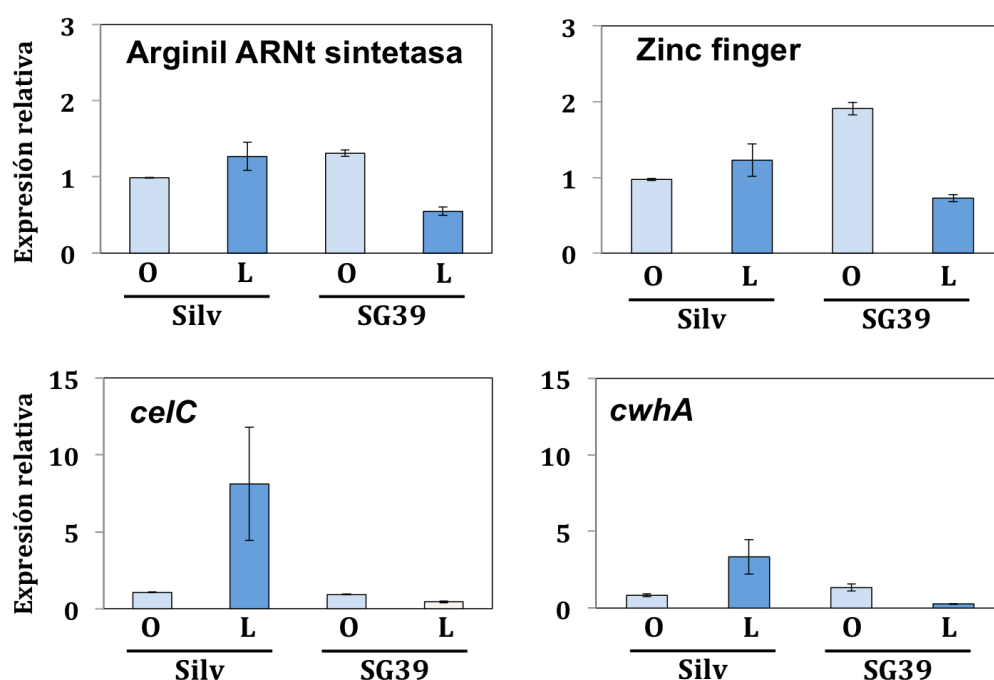
El gen de la  $\beta$ -glucosidasa obtenido en el escrutinio es homólogo al gen *cel3c* de *Trichoderma reesei*, que en esta Tesis llamaremos *celC*. El genoma de este hongo, conocido por su considerable potencial celulolítico, codifica para dos  $\beta$ -glucosidasas ya caracterizadas (BGLI/CEL3A y BGLII/CEL1A) y otras cinco (CEL3B, CEL3D, CEL1B, CEL3C, CEL3E) deducidas por su secuencia (Häkkinen et al. 2012). Las  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan los residuos  $\beta$ -D-glucosilos no reductores de los oligómeros obtenidos en la degradación de la celulosa. Pueden tener que ver, por tanto, con procesos de utilización de celulosa como fuente de carbono, aunque no se descarta algún papel en procesos de reorganización de la pared celular. La capacidad celulolítica de *F. fujikuroi* no ha sido objeto de estudio, y las implicaciones de una posible conexión regulatoria entre CarS y una  $\beta$ -glucosidasa son totalmente desconocidas. En la discusión se considera alguna posible conexión con la función de CwhA.

En el caso de la proteína con un dedo de zinc, la secuencia obtenida corresponde con la región 3' no traducida (3' UTR) predicha para este gen y no incluye

por tanto ningún dominio de la hipotética proteína, por lo que se trata probablemente de una interacción casual con una secuencia traducida accidentalmente.

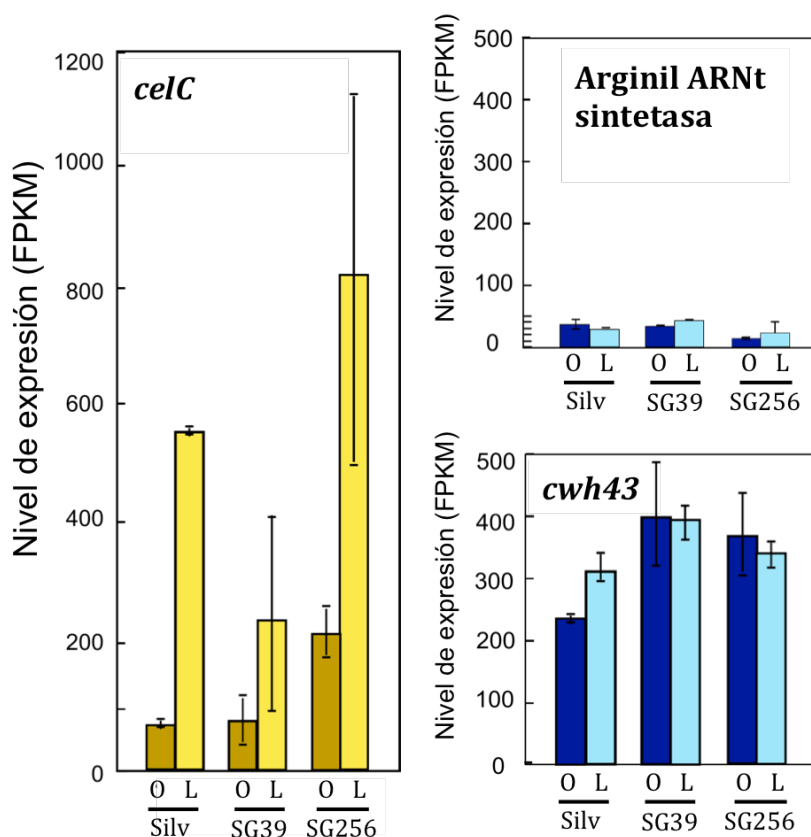
### 1.7. Expresión de los genes candidatos

Por su posible conexión funcional, se decidió investigar el efecto de la mutación del gen *carS* sobre los niveles de ARNm de estos genes y su posible regulación por la luz. Aunque hay motivos para sospechar que la detección del gen para la proteína con un dedo de zinc es un artefacto, se incluyó en el análisis por precaución, y como control externo. Para ello se cultivó el micelio de la estirpe silvestre y del mutante SG39 en oscuridad o se iluminó durante 1 hora. Las muestras de ARNm utilizadas fueron las mismas empleadas en el análisis de RNA-seq descrito en el capítulo siguiente. Los valores, obtenidos mediante RT-PCR se relativizaron al de la estirpe silvestre en oscuridad.



**Figura 1.17. Efecto de la mutación *carS* y la luz sobre la expresión de los genes candidatos obtenidos en el escrutinio de interacción con CarS mediante el doble híbrido.** Los micelios de la estirpe silvestre y del mutante *carS* (SG39) se cultivaron en oscuridad total durante tres días y luego fueron iluminados durante una hora con luz blanca (L) o se mantuvieron en oscuridad (O). A. Gen de la arginil ARNt sintetasa, B. Zinc finger protein. C. Gen de la  $\beta$ -glucosidasa *celC*. D. Gen del receptor *cwhA*. Los valores de expresión fueron relativizados a los valores de la tubulina y como control endógeno se tomaron los valores del silvestre en oscuridad.

Los resultados mostraron ausencia de efectos significativos para los genes de la arginil ARNt sintetasa y de la proteína con dedo de zinc (gráficos superiores en Fig. 1.17). Sin embargo, en el caso de los genes *celC* y *cwhA* se observó un incremento de sus transcritos en la luz, que no se aprecia en el mutante *carS*. Los resultados fueron coherentes con los observados en el análisis de RNA-seq (Fig. 1.18). En este caso no se muestra el gen correspondiente a la proteína Zinc Finger, por tratarse de un falso positivo.



**Figura 1.18.** Cuantificación por RNA-seq del efecto de la mutación *carS* y la luz sobre la expresión de los genes *celC* y *cwhA* y del gen de la arginil ARNt sintetasa.



## **IV. CAPÍTULO 2**

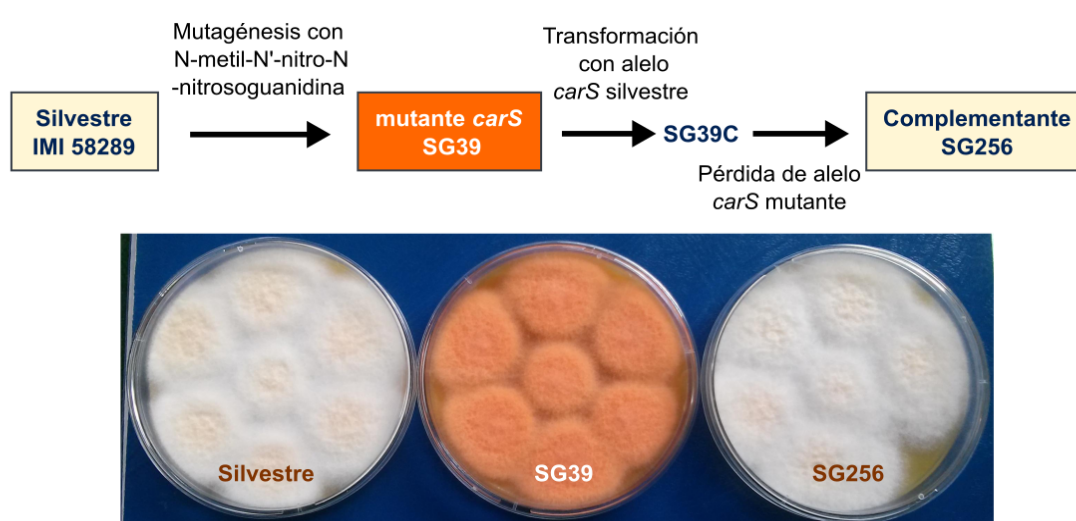




## IV. CAPÍTULO 2. EFECTO DE LA MUTACIÓN *carS* Y DE LA LUZ SOBRE EL TRANSCRIPTOMA DE *F. fujikuroi*

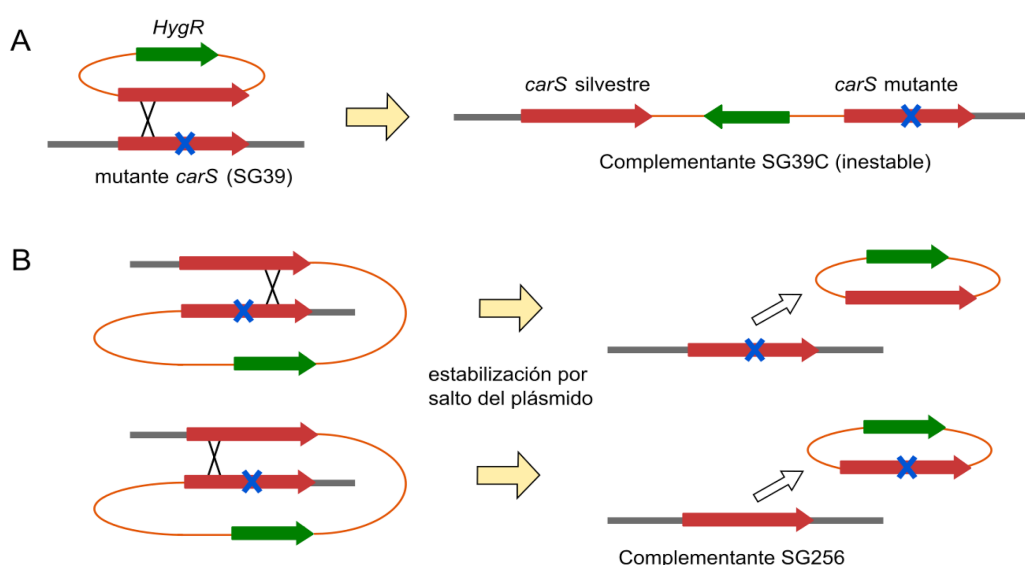
### 2.1 Diseño experimental

La tecnología RNA-seq, basada en métodos de secuenciación masiva, es actualmente la herramienta más potente para estudios de expresión génica. Sin embargo, como es frecuente con numerosas técnicas experimentales modernas, requiere un elevado control de calidad en sus pasos. Los datos de RNA-seq poseen dos fuentes de variación: biológica y técnica. El diseño experimental debe realizarse de forma que a la hora de interpretar los datos no se confundan ambas fuentes de variación (Auer y Doerge, 2010). Para la variación técnica y la calidad de las lecturas se han seguido métodos estandarizados en esta tecnología, como el “barcoding”, que tiene en cuenta la presencia de las secuencias de los adaptadores en las lecturas. Los barcoding constituyen más del 20 % de la lectura de secuenciación, pero la inclusión de ambas secuencias proporcionan un filtro útil para eliminar lecturas erróneas y la estimación de las tasas de error de secuenciación (Degnan, P. H. et al, 2012). En este capítulo podemos observar la eliminación de adaptadores de nuestras muestras en la figura 2.3.C. Como fuente de información sobre el grado de variabilidad biológica, se compararon los resultados de dos réplicas de cada condición y estirpe.



**Fig. 2.1. Proceso de generación de las estirpes SG39 y SG256, utilizadas en el análisis transcriptómico.** Se muestran abajo el aspecto de las estirpes sobre medio sólido.

Para el análisis de la mutación del gen *carS* se utilizó la estirpe mutante SG39, procedente de una mutagénesis con nitrosoguanidina de la estirpe silvestre IMI58289 (Fig. 2.1, Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). La elección de SG39 se debe tanto al conocimiento de la mutación en el gen *carS* (sustitución de Cys<sub>250</sub> por Tyr debido a una transición G<sub>749</sub> a A) como a la demostración de su complementación con un alelo *carS* silvestre en la estirpe SG39C (Rodríguez-Ortiz et al., 2013). La complementación en SG39C da lugar a un fenotipo inestable, manifestado por la aparición de sectores naranja. Esto es debido al salto del plásmido con el gen silvestre, dejando el alelo mutante y restaurando por tanto el fenotipo mutado de SG39 (Fig. 2.2). Sin embargo, eventualmente el lugar de recombinación del plásmido se produce de forma que el alelo silvestre permanece en el genoma, dando lugar a un complementante estable. Se ha aislado una estirpe de estas características, que hemos denominado SG256 (aislamiento y caracterización realizada por Javier Pardo-Medina). El complementante SG256 tiene por tanto el mismo fondo genético que el mutante SG39, con las mutaciones secundarias que haya producido el tratamiento mutagénico, excepto que posee el alelo silvestre del gen *carS*. De hecho, esta estirpe ha recuperado el fenotipo silvestre para la síntesis de carotenoides (Fig. 2.1).



**Fig. 2.2. Proceso de generación del complementante SG256 mediante pérdida del plásmido en el complementante original SG39C.**

**A.** Generación de la estirpe complementante SG39C, que posee dos copias en tándem del gen *carS* separadas por ADN plasmídico con el gen de resistencia a higromicina (en verde). La mutación en el gen *carS* (en rojo) se indica por una X azul.

**B.** El plásmido puede saltar del genoma de SG39C por recombinación homóloga entre las dos copias del gen *carS*. En función de donde ocurre la recombinación, permanece en el genoma la copia silvestre o la copia mutada del gen *carS*.

Una vez elegidas las estirpes, como condiciones de cultivo se escogieron la incubación de 3 días en oscuridad en medio líquido y la eventual exposición del cultivo durante una hora de iluminación, por ser éstas las condiciones en las que se produce el mayor incremento en los transcritos de los genes del *cluster car* como consecuencia de su fotoinducción (Avalos y Estrada, 2010). Una vez fijadas las condiciones, se realizaron los cultivos de las tres estirpes en paralelo, en dos réplicas biológicas independientes y no solapadas en el tiempo. Por tanto, las seis combinaciones de estirpes y condiciones experimentales elegidas para llevar a cabo el estudio fueron las siguientes:

Estirpes	Condiciones	
Estirpe silvestre (IMI58289)	3 d en oscuridad	+ 1 h Luz blanca
Mutante <i>carS</i> (SG39)	3 d en oscuridad	+ 1 h Luz blanca
Complementante <i>carS</i> (SG256)	3 d en oscuridad	+ 1 h Luz blanca

## 2.2. Control de la calidad de las muestras de ARN

La tecnología RNA-seq genera gran cantidad de datos. Sin embargo, como paso previo al análisis de las secuencias, es importante evaluar la calidad de las muestras de ARN empleadas así como la de los propios datos de la secuenciación (Levin et al., 2010, Van Verk, M. C. et al., 2013., Zhou et al., 2013). El ARN total de cada condición se obtuvo con trizol, se trató con DNasa y se purificó mediante su paso por una columna de un kit comercial (“Nucleospin DNase” Macherey Nagel, ver detalles del proceso en materiales y métodos). La calidad e integridad de las muestras de ARN se evaluó por visualización en gel de agarosa, y mediante espectrofotometría en “Nanodrop”. Finalmente, la casa comercial a cargo de la secuenciación (LifeSequencing, Valencia) evaluó su calidad analizando el parámetro RIN de cada muestra. Este valor, que oscila entre 1 y 10, se basa en la cuantificación de productos de degradación del ARN a lo largo de su migración electroforética. El valor de RIN de las muestras enviadas a secuenciar osciló entre 9 y 10, siendo 8 el valor de RIN mínimo exigido (Schroeder et al., 2006). No se observaron indicios de degradación, y las subunidades ribosómicas 20S y 18S se detectaron en la relación correcta.

### 2.3. Secuenciación

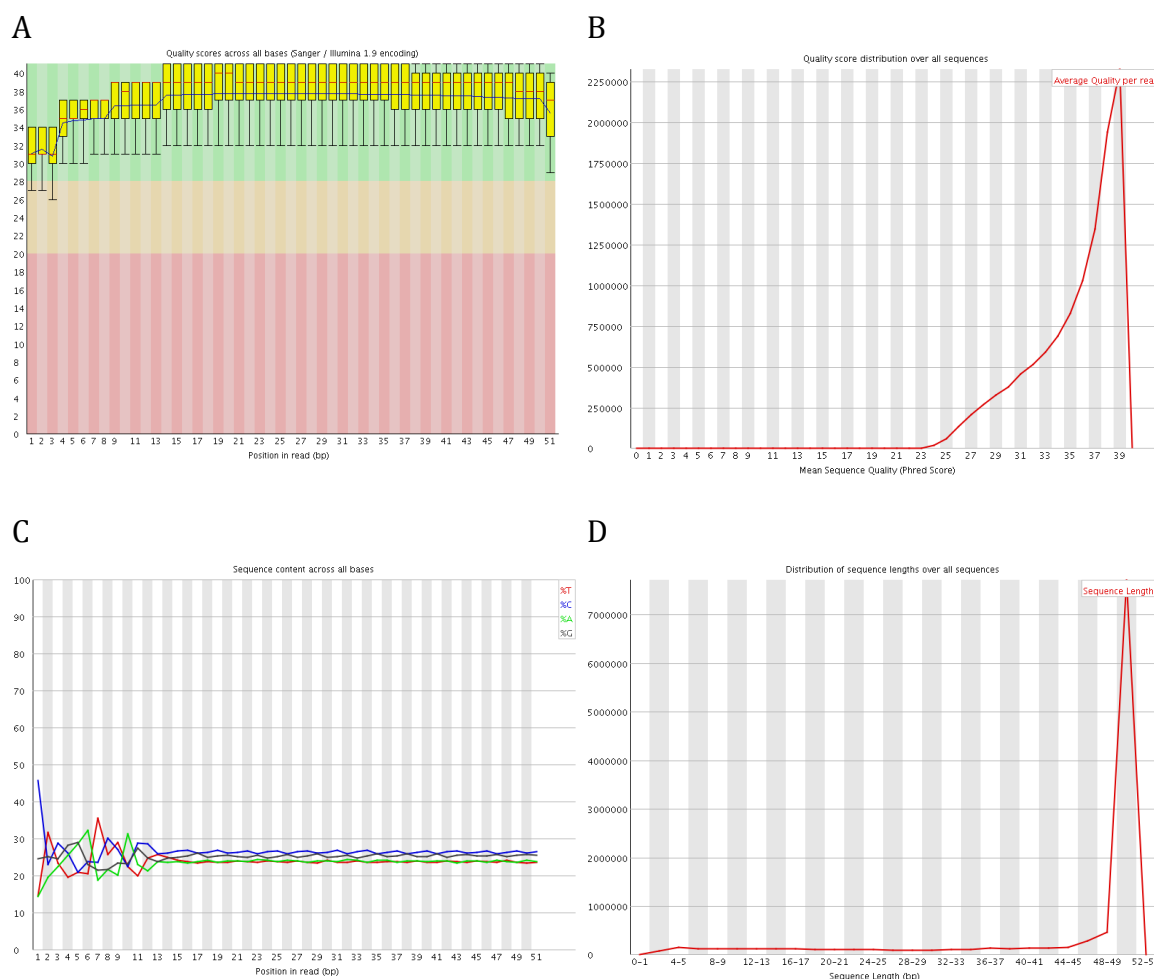
La secuenciación la llevó a cabo la empresa LifeSequencing mediante la plataforma Illumina, en ese momento una de las más avanzadas disponibles (Metzker, 2010). La tecnología empleada no requiere ensamblar el transcriptoma completo, ya que es suficiente una baja proporción de lecturas de pequeños transcritos para detectar la expresión de un gen sin necesidad de detectar un transcrito largo. Por su alta eficiencia, la metodología Illumina proporciona un número de lecturas suficientemente elevado como para garantizar suficiente fiabilidad en los datos de cuantificación de la expresión génica. Además, proporciona otros tipos de información, como puede ser la existencia de polimorfismos (Ozsolak y Milos, 2011, ver materiales y métodos). Las lecturas obtenidas y sus características básicas se describen en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1: número de lecturas y rendimiento de las secuenciaciones del análisis RNA-seq.**

Muestra	nº lecturas (x 10 <sup>6</sup> )	Contenido en G+C (%)	Longitud media de lecturas	calidad *
S1 osc (1)	11,0186	52	43,17	36,87
S1 osc (2)	10,2365	52	43,2	36,88
S1 luz (1)	9,1666	52	43,17	36,9
S1 luz (2)	9,4444	52	43,12	36,88
SG39 osc (1)	8,3483	51	43,28	36,92
SG39 osc (2)	8,5161	51	43,27	36,91
SG39 luz (1)	8,5060	52	43,22	36,9
SG39 luz (2)	16,1490	52	43,15	36,9
SG256 osc (1)	9,9572	52	43,12	36,91
SG256 osc (2)	9,9598	52	43,07	36,82
SG256 luz (1)	9,7168	52	42,91	36,81
SG256 luz (2)	8,7811	51	43,3	36,91

\* calidad referida a la posición nucleotídica para todas las lecturas detectadas en la secuenciación (ver también figura 2.3.A).

En el genoma de *F. fujikuroi* (Wiemann et al., 2013), los marcos abiertos de lectura (ORFs) anotados representan el 49,2 % del genoma, con una longitud codificante media de 1.457 nucleótidos. El número medio de exones por gen es 2,8 y la longitud media de cada exón es 518 nucleótidos. El contenido global G+C es 47,4%, que se eleva a 51,5% en las secuencias de los ORFs.



**Figura 2.3. Comprobación de la calidad según distintos parámetros visualizados a través del programa FastQC.**

**A.** Representación de calidad según la posición nucleotídica para todas las lecturas detectadas en la secuenciación. Nuestro análisis corresponde a fragmentos de unas 50 bases de longitud, en las cuales no se detectan problemas de calidad apreciables a lo largo de las lecturas. La línea azul representa los valores medios y la línea roja la mediana. Prácticamente todas las lecturas se sitúan en la zona verde, lo que confirma su calidad.

**B.** Medición de la calidad media de cada lectura. En el eje de abscisas se representa la calidad y en el eje de ordenadas el número de lecturas. Se puede apreciar que la calidad media es superior a 30. Secuencias con más de una distribución y valores menores a 20 indicarían problemas de calidad.

**C.** Distribución del contenido de bases. Se aprecia una distribución uniforme, sin desviaciones, excepto en un bajo número de secuencias, en las que al principio de la lectura se da el típico problema de eliminación de adaptadores en el extremo 5'. Esto se considera normal en el método y no altera los resultados. El contenido en G+C permanece constante y próximo a valor de 50% detectado previamente, lo que refuerza la inexistencia de contaminación.

**D.** Medición de la calidad con respecto a la técnica de secuenciación en sí. Se observa que la inmensa mayoría de lecturas se sitúan en torno a las 50 bases.

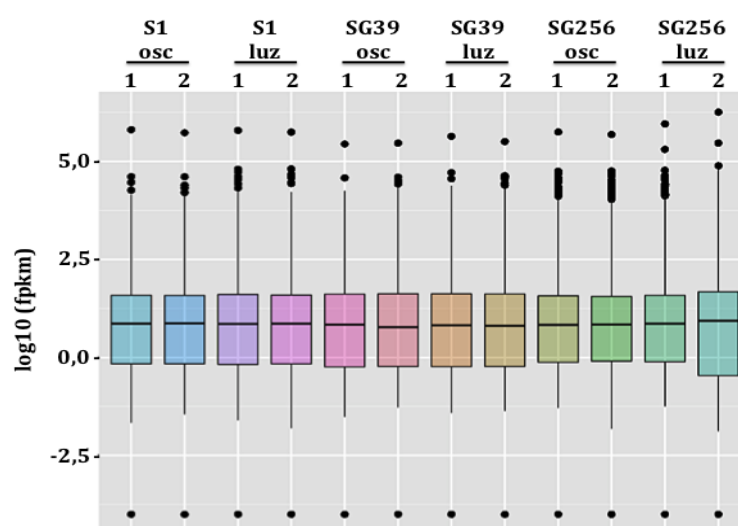
Las secuencias obtenidas en nuestro estudio de RNA-seq tienen un contenido medio G+C próximo a 52%, lo que concuerda bien con el valor medio esperado de 51,5%, aportando un nuevo indicio de calidad de las muestras. Con respecto a la

calidad de secuencias, su análisis con el paquete FastQC arrojó perfiles similares para todas las muestras (Fig. 2.3).

Los datos globales de las secuencias, en relación al genoma anotado, reveló la identificación de transcritos para 15.095 genes, con 15.106 isoformas, y asignables a 14.815 secuencias codificantes. Estos números correlacionan muy bien con el número de inicios de la transcripción identificados, que fue de 15.101. El programa detecta por otro lado un número muy elevado de *splicing* (226.515), que incluye numerosos casos de maduración alternativa.

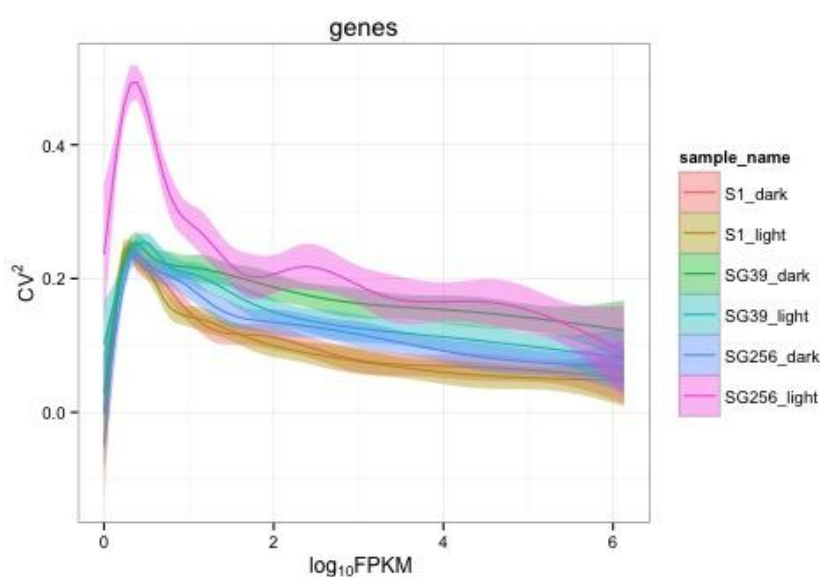
## 2.4 Análisis de la expresión génica

Una vez calibrada la calidad de las lecturas, se procedió a asignar valores de expresión a cada gen en las distintas muestras analizadas, utilizando para ello el protocolo “Tuxedo” (ver materiales y métodos). La representación de los datos en gráficos *box plot* (Fig. 2.4) muestra un elevado grado de paralelismo entre todas las muestras, incluyendo las réplicas biológicas entre sí, con medias (trazo central en cada caja) y cuartiles muy similares. De aquí en adelante, se considera ya cada condición y estirpe por separado, utilizando la media de las dos réplicas como valor de expresión en cada condición experimental, descartando en el análisis los datos que no cumplieron con un grado mínimo de repetición en las dos réplicas.



**Figura 2.4: Representación Boxplot de las muestras empleadas en el estudio.** Las cajas representan el 50% de la variación ( $\pm 1$  cuartil), y el trazo interior indica la media. Los puntos indican los genes más alejados de la media, tanto para la represión (valores negativos para el eje Y) como para la activación (valores positivos para el eje Y)

La representación global de la variación entre las réplicas en función de los niveles de expresión (FPKM) muestra un grado de variación mayor para los genes con valores bajos de expresión, y un grado de repetitividad creciente a medida que aumenta la expresión (Fig. 2.5). Las distribuciones fueron parecidas en las diferentes estirpes y condiciones de cultivo, considerando poco relevantes las diferencias observadas con las muestras de SG256 en la luz, como único caso con un patrón diferente al resto.



**Figura 2.5. Distribución global de la repetitividad de la expresión entre réplicas biológicas en función de los valores de dicha expresión.** La línea interior indica el valor medio de variación. CV: coeficiente de variación para medir la dispersión entre lecturas.

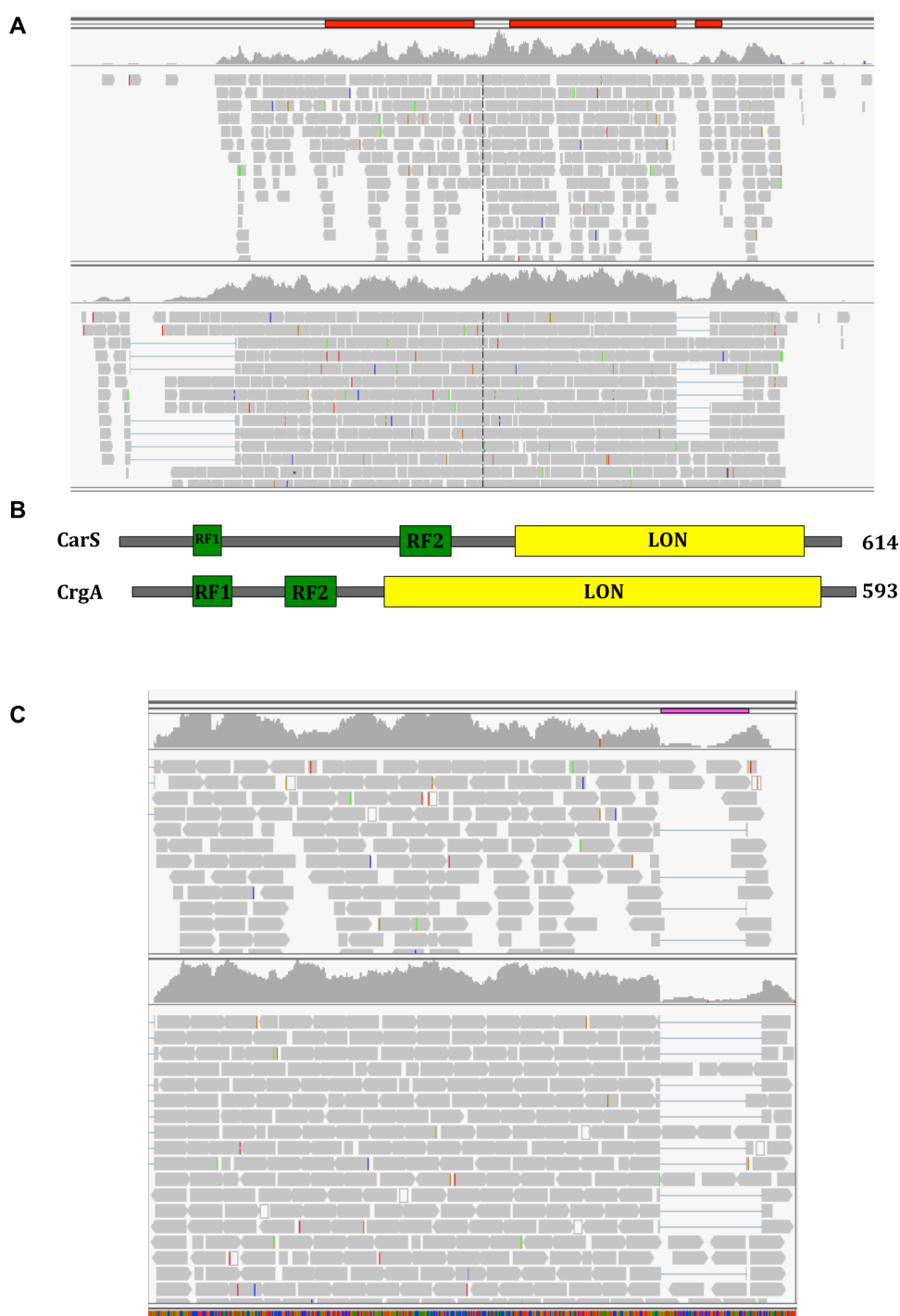
## 2.5 Análisis del transcrito del gen *carS*

Los datos de RNA-seq proporcionan información sobre la longitud e integridad de los transcritos de todos los genes expresados. En el análisis de los datos se prestó especial atención al transcrito del gen *carS*. La visualización de la cobertura de las lecturas de RNA-seq respecto al ORF del gen *carS* muestra que la transcripción del gen se inicia aproximadamente 500 bases aguas arriba del sitio de inicio de la traducción (Fig. 2.6A), lo que da lugar a un transcrito con un largo segmento de ARN no traducido, posiblemente implicado en la regulación de la estabilidad o traducibilidad del propio ARNm.

La anotación del gen *carS* en las bases de datos (código de acceso HF568953) incluye dos intrones. El primero de ellos se encuentra en la región central del gen, próximo a la secuencia codificante del dominio RING finger de la proteína. Sorprendentemente, la cobertura de fragmentos secuenciados en los datos de RNA-seq cubre dicho intrón (Fig. 2.6A), indicando que no se elimina de los ARNm *carS*. La conservación del intrón mantiene la pauta de lectura de la proteína y no posee codones de terminación en fase, y da lugar por tanto a una proteína completa. Como confirmación adicional de la conservación del intrón, la nueva secuencia de la proteína incluye ahora un nuevo dominio RING finger de secuencia más canónica que el anterior, cuya secuencia estaba incluida parcialmente en el intrón. Por tanto, la estructura de la proteína CarS es más similar a la de CrgA de *M. circinelloides* en la región del extremo amino de la proteína (Fig. 2.6B) de lo que se pensaba previamente.

Un análisis minucioso de la región del segundo intrón permite observar que no se elimina siempre (Fig. 2.6C). La secuencia del intrón tiene un codón de parada en fase muy próximo a su extremo 5', por lo que, en caso de no eliminarse, se produciría una proteína truncada, carente de los últimos 19 aminoácidos, que se desconoce si sería funcional.





**Figura 2.6. Visualización de lecturas del análisis RNA-seq para el gen *carS* y comparación de la proteína resultante con su homólogo CrgA.**

**A.** Lecturas mapeadas mediante IGV del gen *carS* de la estirpe silvestre de *F. fujikuroi* en oscuridad (arriba) y en luz (abajo). La línea superior roja indica la secuencia codificante de *carS* antes de la corrección. Los huecos delimitan los dos intrones.

**B.** Comparación de CarS con CrgA de *M. circinelloides*. La alineación de las dos proteínas se hizo al principio del primer RF.

**C.** Detalle de las lecturas mapeadas en la región próxima al extremo 3' del gen *carS* en las mismas condiciones del esquema A. La línea rosa muestra la localización del segundo intrón, para el que se observan lecturas en algunos casos.

## 2.6 Análisis de la expresión génica diferencial

Para identificar los genes con diferencias significativas en los niveles de sus transcritos entre las distintas condiciones biológicas ensayadas, se utilizó un valor  $p$  de 0,05. Una vez que lo definimos como umbral, este valor nos proporciona el dato de “significancia”, y suele oscilar entre 0,1 y 0,01. Los valores  $p$  son estadísticos y se obtienen a partir de la  $t$  de student, que tiene en cuenta la media entre las réplicas y su varianza.

Como medida indicativa de expresión diferencial se consideró un factor de proporcionalidad. Este factor estima cuanto cambia el valor de expresión de un gen desde su mínimo hasta su máximo a lo largo de las comparaciones. Como criterio de expresión diferencial, se eligió para todas las comparaciones un factor de 2, tanto de activación como de represión, que al analizarse en función del logaritmo en base 2, corresponde a un valor de logaritmo igual a 1. Aquellos genes cuyo cambio en los niveles de expresión (originalmente denominado *fold-change*, que llamaremos aquí cambio relativo, o CR) sea superior a este umbral se considerarán sobreexpresados o activados, y aquellos con un valor inferior al valor umbral, reprimidos. El empleo de un umbral relativamente bajo asegura que no se descarte ningún posible efecto regulatorio, aunque será más significativo a medida que dicho umbral aumente. Para el efecto de la mutación del gen *carS*, se exigió además la recuperación del nivel de expresión silvestre en la estirpe complementante SG256, descartando aquellos genes que no cumplieron este requisito.

En la tabla 2.2 se resumen del número de genes activados y reprimidos como consecuencias de la luz y de la mutación *carS* en las distintas combinaciones de interés. Se puede apreciar que la luz y la mutación *carS* tienen impactos similares en el transcriptoma, con alteraciones en la expresión de aproximadamente el 4-5% de los genes del genoma. El número de genes influidos por la luz es mucho menor en el mutante *carS* en comparación con la estirpe silvestre, lo que indica que la desregulación producida por la mutación *carS* en muchos genes afecta a su capacidad de respuesta a la luz. Este dato tiene considerable interés, pues aporta un indicio sobre la existencia de conexiones regulatorias entre el mecanismo molecular de control por la luz y la función de la proteína CarS.

**Tabla 2.2.** Número de genes cuya expresión sube significativamente más del doble (activados) o baja más de la mitad (reprimidos) en las condiciones indicadas. Se indica a la derecha de cada valor el porcentaje respecto al total de genes detectados en el ensayo de secuenciación.

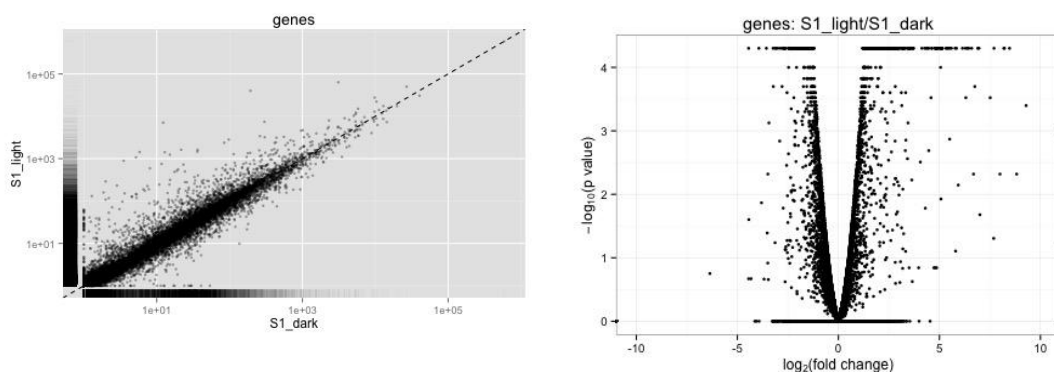
	Activados	%	Reprimidos	%
Efecto de la luz en la estirpe silvestre	723	4,78	535	3,54
Efecto de la mutación <i>carS</i> en oscuridad	716	4,74	821	5,43
Efecto de la mutación <i>carS</i> en la luz	509	3,37	633	4,19
Efecto de la luz en el mutante <i>carS</i>	173	1,14	112	0,74
Efecto de la luz en el complementante SG256	876	5,80	244	1,62

La mayoría de los genes activados y reprimidos como consecuencia de la luz o de la mutación *carS* muestran cambios menores en los niveles de expresión. Esto se aprecia mejor en comparaciones gráficas de dos condiciones, en los que cada punto representa un gen (Fig. 2.7). Se aprecia que la mayoría de genes detectados se agolpan en la región próxima al umbral elegido. Sin embargo, la observación detallada de estos gráficos permite también sacar otras conclusiones interesantes. Por ejemplo, se puede apreciar que no solo es mayor el número de genes inducidos que reprimidos por la luz (Tabla 2.2), sino que el número de genes con cambios importantes en los niveles de expresión es mucho mayor entre los genes inducidos que entre los reprimidos. De forma similar, en relación al efecto de la mutación *carS*, los cambios más importantes se encuentran en los genes cuya expresión aumenta en el mutante *carS*, lo que proporciona un nuevo argumento en la dirección de que la proteína CarS es principalmente un regulador negativo. No se descartan sin embargo funciones reguladoras positivas, ya que aunque el efecto global es menor, son notables también las pérdidas de expresión de muchos genes en el mutante *carS* (gráfico 2 en Fig. 2.7).

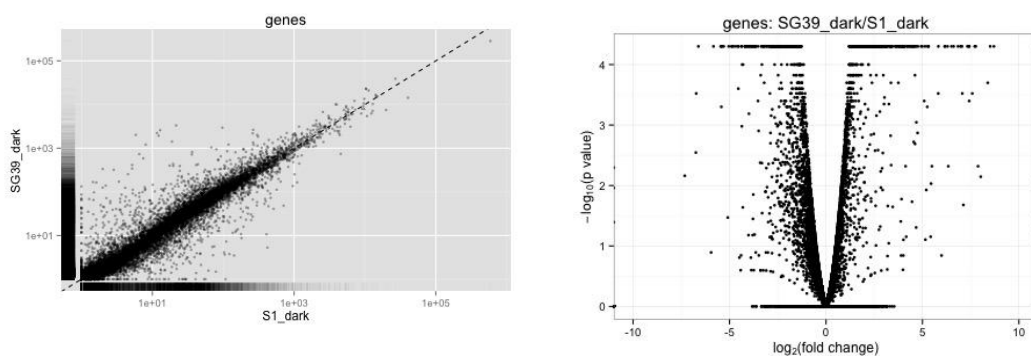
Los resultados mostrados en la Fig. 2.7 visualizan de forma más patente la pérdida de fotoregulación en muchos genes a causa de la mutación en el gen *carS*. Así, se puede observar que los genes con el mayor grado de fotoinducción en la estirpe silvestre (ver puntos más alejados por encima de la diagonal en el gráfico 1) se han perdido en el mutante *carS* (gráfico 4). Sin embargo, el efecto es mucho menor para

los genes reprimidos por la luz. Llama también la atención que no solo aumenta el número de genes reprimidos en la luz en el mutante *carS* en relación a la estirpe silvestre, sino que un cierto número de estos genes muestran un grado de fotorrepresión mucho mayor (comparar la parte inferior a la diagonal en los gráficos 1 y 3).

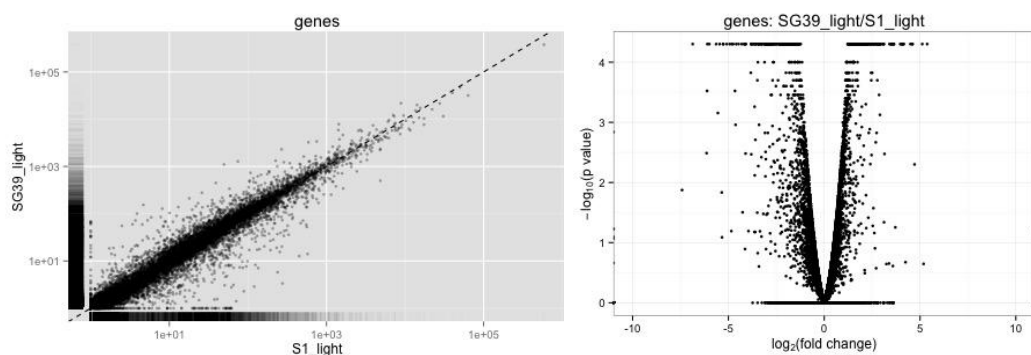
### 1. Efecto de la luz en la estirpe silvestre (Silvestre luz vs silvestre oscuridad)



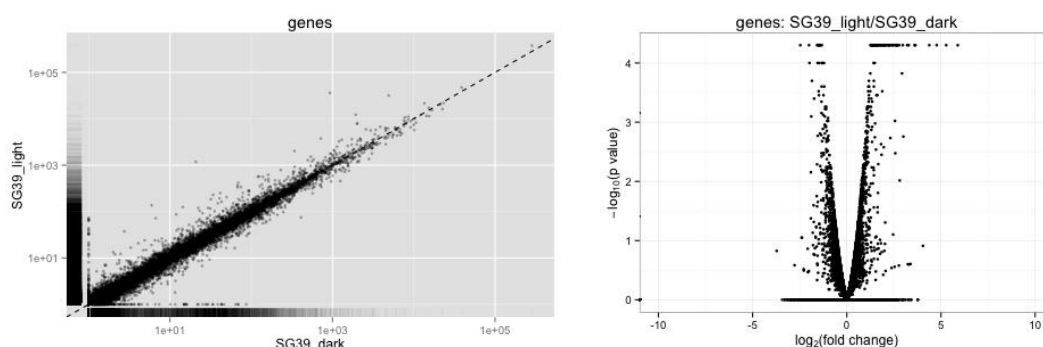
### 2. Efecto de la mutación *carS* en oscuridad (Silvestre oscuridad vs SG39 oscuridad)



### 3. Efecto de la mutación *carS* en la luz (Silvestre luz vs SG39 luz)



#### 4. Efecto de la luz en el mutante *carS* (SG39 oscuridad vs SG39 luz)



**Figura 2.7.** Representaciones en “Scatter plot” (gráficos izquierdos) y “volcano plot” (gráficos derechos) de las distribución de la expresión génica en las estirpes y condiciones indicadas en la parte superior de cada pareja de gráficos.

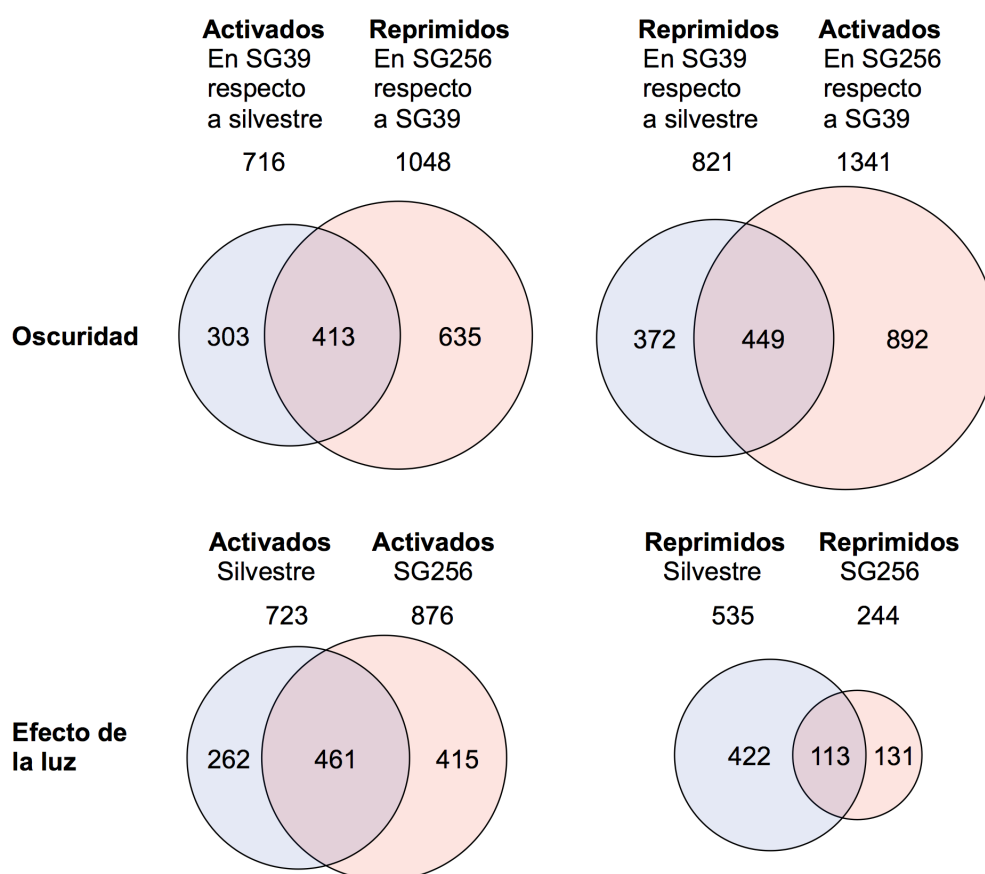
### 2.7 Restauración del fenotipo silvestre en la estirpe complementante SG256

Como se ha indicado anteriormente, dado que el mutante *carS* puede llevar otras mutaciones que puedan afectar a los resultados, se incluyó en el análisis la estirpe complementante SG256 (ver sección 2.1), derivada del mutante SG39 por reemplazamiento del alelo *carS* mutante por un alelo *carS* silvestre. Para descartar posibles efectos de mutaciones secundarias en SG39, se adoptó el criterio de catalogar como genes inducidos o reprimidos a causa de la mutación *carS* sólo aquellos que recuperan el nivel de expresión silvestre en la estirpe complementante SG256.

Puesto que el cambio de expresión de muchos genes se encuentra próximo al umbral de corte de x2 o x0,5, cabe esperar que el ruido estadístico haga que muchos genes inducidos o reprimidos no se repitan en la estirpe SG256. Para obtener más información sobre este posible efecto de distorsión en los datos se realizaron comparaciones de los juegos de genes activados o reprimidos en SG256, en comparación con el mutante *carS* del que deriva y en comparación con la estirpe silvestre respecto al efecto de la luz (Fig. 2.8). Como se puede apreciar, aproximadamente un 55% de los genes cuya expresión aumenta o disminuye en el mutante *carS* SG39, recuperan su expresión basal en el complementante SG256. Como efecto indirecto indeseado, hay también un número considerable de genes cuya expresión baja en el complementante SG256 sin que hubiera sido detectada su subida en el mutante *carS*, o al contrario, lo que indica que son muchos los genes que estando próximos al umbral de corte, se clasifican o no como inducidos o reprimidos por azar.

En los análisis posteriores, sólo consideramos como activados o reprimidos los 423 genes y 449 genes (respectivamente) confirmados en el complementante SG256 (Fig. 2.8, gráficos superiores).

El nivel de coincidencia entre la estirpe silvestre y el complementante SG256 en relación a la luz (Fig. 2.8, gráficos inferiores) aporta información sobre la similitud genética de ambas estirpes. El grado de coincidencia fue mucho mayor para los genes inducidos por la luz que para los reprimidos (64% frente a 21%, datos relativos al número de genes regulados por luz en la estirpe silvestre), sugiriendo que los casos de represión contienen más genes con cambios en la expresión génica atribuibles a otras causas, más que al efecto de la luz.

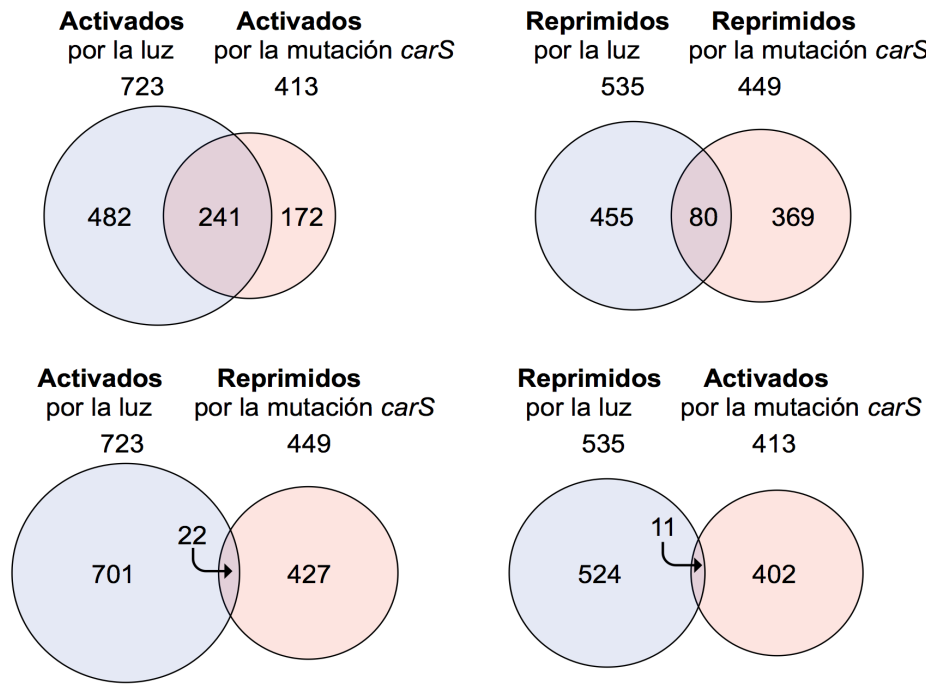


**Figura 2.8. Grado de recuperación del patrón de expresión silvestre en el complementante SG256.** Arriba: Diagramas de Venn de la correlación entre genes activados o reprimidos en el complementante SG256 respecto al mutante *carS* en la oscuridad. Abajo: Diagramas de Venn de las coincidencias entre los genes activados y reprimidos por la luz en la estirpe silvestre y en el complementante SG256. El número de genes coincidentes se recoge en la zona central. en esta Figura y en las dos Figuras siguientes, las superficies de los círculos y de las zonas centrales coincidentes son proporcionales a los números de genes.

## 2.8. Relación entre los efectos de la luz y de la mutación *carS*

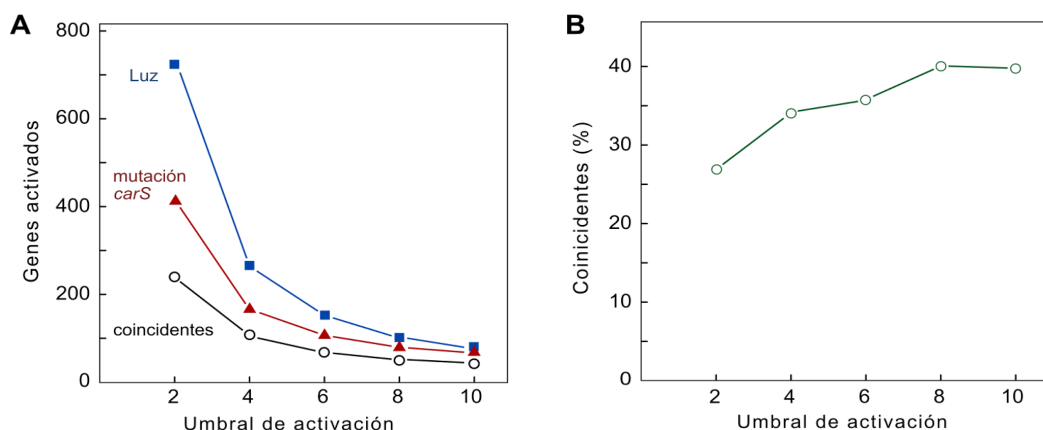
Una vez filtrados los genes influidos por *carS* como aquellos que recuperaron su patrón de expresión silvestre en el complementante SG256, se procedió a estudiar su correlación con los genes afectados por la luz (Fig. 2.9). La comparación de los juegos de genes activados/reprimidos por la luz o por la mutación *carS* mostraron un grado muy elevado de correlación para el caso de la activación en ambas condiciones (gráfico superior izquierda en Fig. 2.9). De acuerdo con sus porcentajes sobre los 15.095 genes del genoma, si ambos fenómenos fueran independientes, el número de genes coincidentes entre los genes activados por la luz o por la mutación *carS* sería aproximadamente de 20, cuando el número identificado (241 genes) es un orden de magnitud superior.

También salen más que lo esperado por azar en el caso de los genes reprimidos, ya que se obtienen 80 cuando solo se esperan por azar unos 15. Existe, por tanto, un alto grado de grado de correlación entre los genes activados o reprimidos por luz y por la ausencia de una proteína CarS funcional, lo que aporta una evidencia muy significativa de la conexión entre el control ejercido por CarS y la regulación por la luz. Dicha correlación se pierde si se comparan los juegos de genes activados por la luz y reprimidos por la mutación *carS*, o viceversa (gráficos inferiores en la Fig. 2.9), ya que los genes coincidentes se corresponden aproximadamente a los esperados por azar.



**Figura 2.9. Solapamientos entre los genes activados y reprimidos por luz o por la mutación en el gen *carS*.** Los números de genes y los gráficos de Venn corresponden a las condiciones indicadas encima. El número de genes coincidentes se recoge en la zona central.

El grado de coincidencia entre los genes activados por la luz y por la mutación *carS* aumenta a medida que se emplea un umbral mayor de incremento en la expresión. Lógicamente, el número de genes que supera el umbral disminuye paulatinamente (Fig. 2.10A), pero el grado de coincidencia aumenta hasta alcanzar aproximadamente un 40% de los genes en ambas condiciones (Fig. 2.10B).



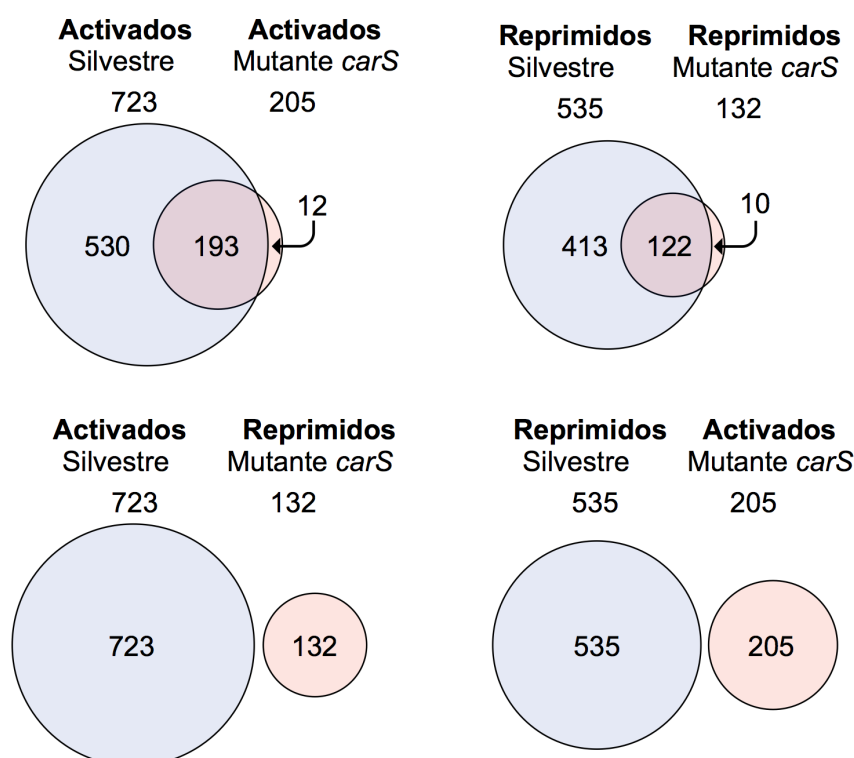
**Figura 2.10. Efecto del umbral de aumento en la expresión sobre el número de genes activados por la luz o por la mutación *carS*.**

**A.** Número de genes activados en ambas condiciones, y genes coincidentes.

**B.** Porcentaje de genes coincidentes en función del umbral de detección.



Como ya se ha indicado, el número de genes activados por la luz es mucho menor en el mutante *carS* que en la estirpe silvestre. En este caso, al comparar ambas colecciones de genes, nos encontramos con un grado de coincidencia muy elevado tanto en los genes activados por luz como en los reprimidos (gráficos superiores en la Fig. 2.11). Este dato indica que hay un juego de genes que son regulados por luz de forma independiente a la función de CarS. Si, por el contrario, se comparan las colecciones de genes activados en una estirpe con los reprimidos en la otra (gráficos inferiores en la Fig. 2.11), no se detecta ninguna coincidencia, confirmando la fiabilidad de los datos anteriores.



**Figura 2.11. Solapamientos entre los genes activados y reprimidos por luz en la estirpe silvestre y en el mutante *carS*.** Los números de genes y los gráficos de Venn corresponden a las condiciones indicadas encima. El número de genes coincidentes se recoge en la zona central. En los dos diagramas inferiores no hubo genes coincidentes.

## 2.9. Identidad de los genes

Los genes activados por luz y por la mutación *carS* se ordenaron por su grado de activación o represión y se identificaron en el proteoma de *F. fujikuroi*. Los listados completos se muestran en el anexo 1. En la Tabla 2.3 se muestran los 6 genes con

mayor grado de activación o represión en cada condición así como el cambio relativo (CR).

**Tabla 2.3. Genes que muestran el mayor cambio en sus expresión por efecto de la luz**

Identidad	CR	Identidad	CR
<b>Efecto de la luz en la estirpe silvestre (silvestre luz vs silvestre oscuridad)</b>			
FFUJ_05633: Función desconocida	$\infty$	FFUJ_06547: Transportador de monosacáridos	0,04590 (-22,2)
FFUJ_12435: Función desconocida	626,05	FFUJ_11613: UP	0,04627 (-21,7)
FFUJ_09119: Oxidasa-oxigenasa de amina.	452,54	FFUJ_02291: Función desconocida	0,06540 (-15,4)
FFUJ_08272: Función desconocida Dominios DUF3140 KIND	353,97	FFUJ_10246: Relacionada con proteoglicanos	0,07141 (-14,1)
FFUJ_11804: Rodopsina CarO	296,83	FFUJ_11430: Tripeptidil peptidasa I	0,08450 (-11,9)
FFUJ_09320: Homólogo de Rds1. Dominio Ferritina_2	291,39	FFUJ_10146: UP. Dominio PA14_2	0,08706 (-11,5)
<b>Efecto de la luz en el mutante <i>carS</i> (SG39 osc vs SG39 luz)</b>			
FFUJ_10028: Función desconocida	$\infty$	FFUJ_09281: Función desconocida	
FFUJ_06055: Fotorreceptor VIVID	593,39	FFUJ_13314: Función desconocida	0,18056 (-5,56)
FFUJ_01292: Función desconocida	387,86	FFUJ_01798: Función desconocida	0,24858 (-4,03)
FFUJ_02302: Polipéptido aromático funcional, Dominio: DHQ_synthase	273,65	FFUJ_10724: Función desconocida	0,25325 (-3,95)
FFUJ_10836: Xilosidasa/arabinosidasa	208,15	FFUJ_06398: Intercambiador calcio/protones	0,26657 (-3,76)
FFUJ_11223: Función desconocida. Dominios: SH3_3 Phage_lysozyme	165,10	FFUJ_12991 : Transportador de azúcares STL1	0,26693 (-3,76)

\*UP: Uncharacterized protein

Tabla 2.4. Genes que muestran el mayor cambio en su expresión por efecto de la mutación *carS*

Identidad	CR	Identidad	CR
<b>Efecto de la mutación <i>carS</i> en oscuridad (silvestre vs <i>carS</i>, ambos en oscuridad)</b>			
FFUJ_05174: Función desconocida	$\infty$	FFUJ_05918: Función desconocida	0,00625 (-166,7)
FFUJ_14350: Pectato liasa	$\infty$	FFUJ_00006: Citocromo P450	0,00931 (-111,1)
FFUJ_08998: Función desconocida	$\infty$	FFUJ_00004: Facilitador principal tipo DHA14; transportador ABC	0,00942 (-111,1)
FFUJ_11804: Rodopsina CarO	416,99	FFUJ_00007: Relacionada con benzoato-p-hydroxilasa	0,01020 (-100)
FFUJ_11472: Catalasa	365,17	FFUJ_00005: Relacionada con isoamil alcohol oxidasa	0,01753 (-58,8)
FFUJ_10321: AlOH DH, Homólogo de Bli4	334,24	FFUJ_14801: Función desconocida	0,02274 (-45,5)
<b>Efecto de la mutación <i>carS</i> en la luz (silvestre vs <i>carS</i>, ambos en luz)</b>			
FFUJ_09847: Ferritina 2	414,10	FFUJ_05633: Función desconocida	
FFUJ_13447: Colágeno	363,98	FFUJ_10626: Función desconocida	0,00584 (-200)
FFUJ_02209: Proteína con cluster Zn	346,67	FFUJ_00005: Isoamil alcohol oxidasa	0,00857 (-125)
FFUJ_10046: proteína de membrana ABC trans	262,25	FFUJ_00006: Citocromo P450	0,01418 (-71,4)
FFUJ_10047: Proteína tipo Dak1/Dak2	244,73	FFUJ_00007: Relacionada con benzoate-p-hydroxylasa	0,01443 (-71,4)
FFUJ_13902: dihidroxiacetona kinasa	240,48	FFUJ_00008: O-metiltransferasa	0,01459 (-71,4)

En consonancia con lo ya mostrado en la Fig. 2.7, llama la atención las enormes diferencias de activación y represión de los genes más influidos por la luz. Así, mientras que los genes más estimulado por la luz en la estirpe silvestre o en el mutante *carS* aumenta su expresión unas 600 veces, el más reprimido solo baja su expresión unas 20 veces en la estirpe silvestre, y unas 5-6 veces en el mutante *carS*. Las diferencias no son tan notables, sin embargo, en el caso del efecto de la mutación *carS*.

En los listados de genes activados por la luz y por la mutación *carS* se encuentran en posiciones muy altas los genes del *cluster car* (*carX*, *carRA*, *carB* y *carO*, anexo 1), destacando entre ellos *carO* como el cuarto gen en fotoestimulación (Tabla 2.3) y el tercero en desrepresión en el mutante *carS* (Tabla 2.4). Este resultado confirma que el *cluster car* es uno de los objetos principales de regulación de la proteína CarS y de la luz. Los efectos de la luz y de la mutación *carS* de los genes *car* se

resumen en la Tabla 2.5. Fuera del *cluster*, se confirma la menor regulación por luz del gen *carS* y de los genes estructurales ubicados fuera del cluster, *carT* y *carD*, especialmente este último. Estos resultados corroboran los datos publicados de regulación por luz y por la proteína CarS de los genes del cluster (ver introducción), y los ubica por primera vez en el contexto del resto del transcriptoma.

**Tabla 2.5. Efecto de la luz y la mutación del gen *carS* sobre la expresión de los genes *car*.**

Genes de la carotenogénesis (número FFUJ_)	Incremento de expresión en luz	Incremento de expresión en el mutante <i>carS</i>	Incremento de expresión en luz en el mutante <i>carS</i>
<i>carX</i> (11801)	96,6	114,7	4,0
<i>carRA</i> (11802)	70,4	208,8	<2
<i>carB</i> (11803)	78,2	160,7	<2
<i>carO</i> (11804)	296,8	416,9	3,9
<i>carT</i> (07962)	11,7	35,1	<2
<i>carD</i> (07503)	3,7	6,1	<2
<i>carS</i> (08714)	5,5	7,4	2,5

Entre los activados por la luz se encuentran también tres genes de fotorreceptores cuya fotoregulación era anteriormente conocida (Tabla 2.6). Se desconocía sin embargo el efecto de la mutación *carS* sobre su expresión. Los niveles de transcrito del gen *vvdA* no se ven afectados por la mutación del gen *carS*, pero los del gen *cryD* se incrementan más de un orden de magnitud en este fondo genético, ejerciendo por tanto en ese caso la luz una activación más reducida. El gen de la fotoliasa Phr se encuentra en una situación intermedia, con un fuerte incremento de sus transcritos también en la luz, y una activación de casi cuatro veces en el mutante *carS*. De nuevo, esta última activación reduce la sensibilidad a la luz del gen *phr* en el fondo genético del mutante *carS*. Este efecto, compartido también por los genes del cluster *car*, o por otros genes, como *carT* o *cryD*, aporta nuevo apoyo a la asociación entre el mecanismo de acción de la luz y el de la proteína CarS. La tabla incluye también el fotorreceptor WcoA, utilizado en los experimentos descritos en el capítulo anterior, y cuyo gen no es regulado por luz. Los datos muestran que tampoco participa en su regulación la proteína CarS.

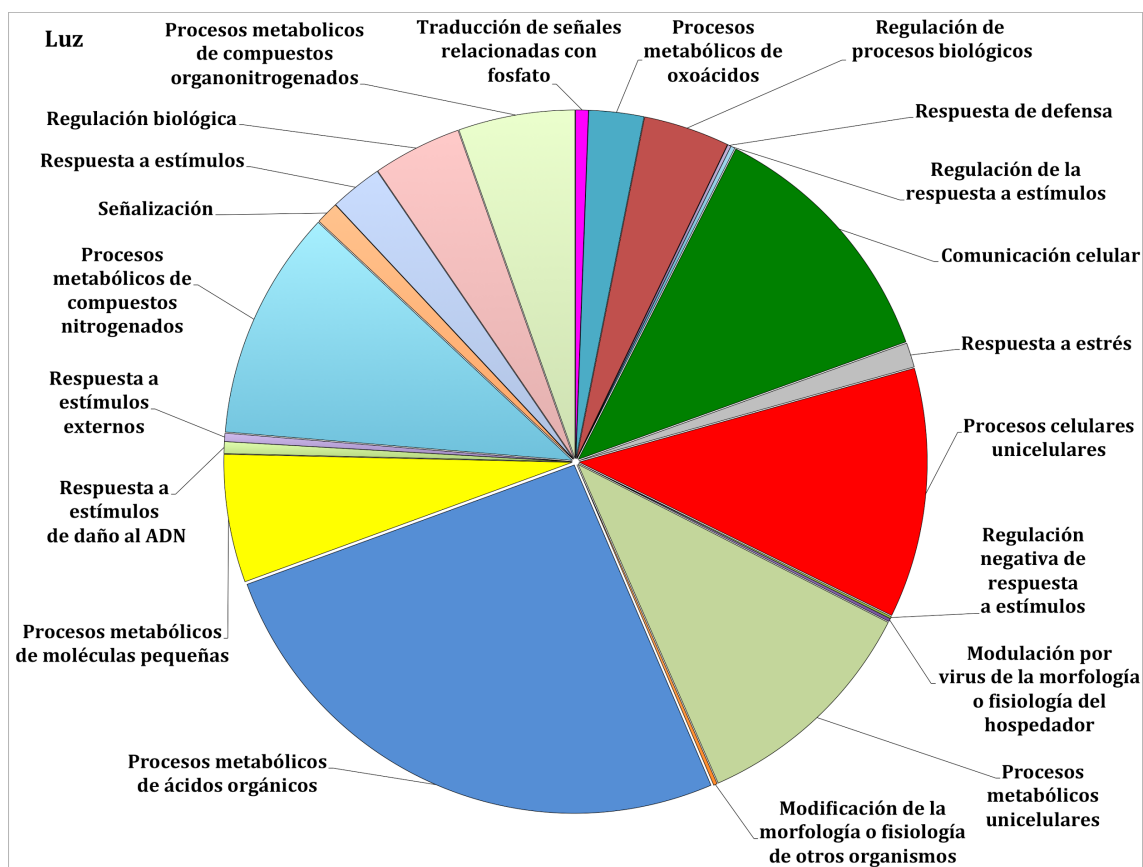
**Tabla 2.6. Efecto de la luz y la mutación del gen *carS* sobre la expresión de los genes de cuatro fotorreceptores anteriormente investigados en *Fusarium*.** Los genes *cryD* (criptocromo DASH), *vvdA* (proteína VIVID), y *wcoA* (White Collar 1) de *F. fujikuroi* se han descrito en la introducción. *phr* codifica la fotoliasa, investigada en *F. oxysporum* (Alejandre-Durán et al., 2003).

Genes de fotorreceptores	Identidad	Incremento de expresión en luz	Incremento de expresión en el mutante <i>carS</i>	Incremento de expresión en luz en el mutante <i>carS</i>
<i>phr</i>	FFUJ_00436	35,1	3,7	9,2
<i>cryD</i>	FFUJ_05732	57,4	12,6	6,9
<i>vvdA</i>	FFUJ_06055	87,4	<2	59,3
<i>wcoA</i>	FFUJ_13691	<2	<2	<2

## 2.10. Categorías funcionales GO de los genes activados por la luz y por la mutación del gen *carS*

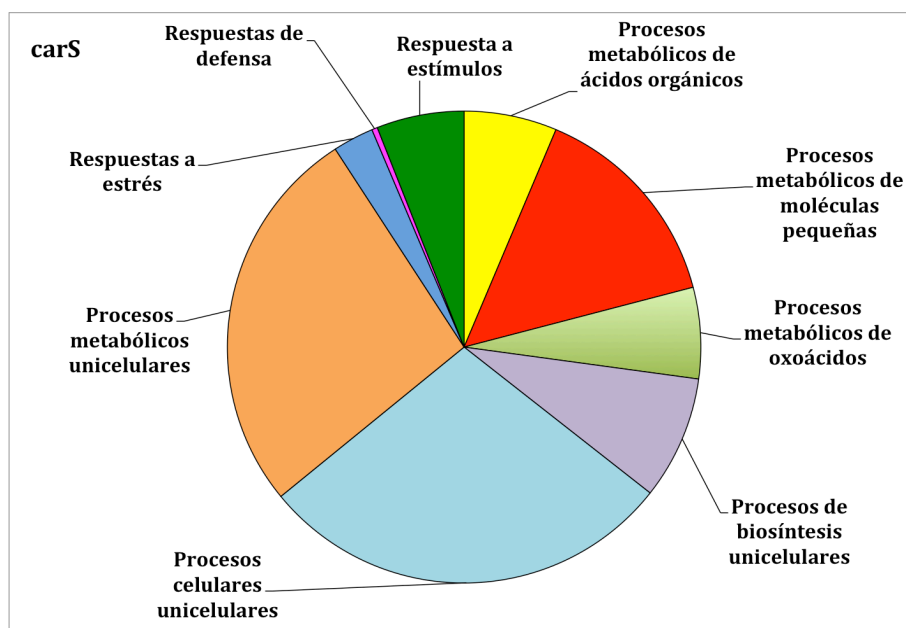
El elevado número de genes cuya expresión se ve alterada por la mutación *carS* indica que la función de la proteína CarS no se limita al control del cluster *car*, sino que se extiende a otras funciones en el hongo. La misma conclusión se puede aplicar al efecto de la luz, más aún considerando los datos que sugieren una conexión entre ambos factores regulatorios. A fin de obtener un visión global del efecto de la luz y de la mutación *carS*, se clasificaron las categorías funcionales de los genes identificados asignando las categorías definidas por el “Gene Ontology Consortium” (<http://geneontology.org>), conocidas como categorías GO. Las categorías se basan en las actividades moleculares, los componentes celulares donde las proteínas son activas y las rutas o procesos biológicos en las que participan, y pretenden hacer una visión unificada para todos los seres vivos.

El protocolo de asignación de categorías se basa en la identificación de dominios PFAM (Bateman et al., 2004), organizada en una base de datos que acumula información sobre alineamientos y estructuras proteicas conocidas. La asignación de dominios PFAM no funciona para todos los genes, ya que la asignación de dominios debe cumplir unos mínimos de identidad en los alineamientos. En el caso del proteoma de *F. fujikuroi*, solo se encuentra al menos un dominio PFAM significativo en aproximadamente el 55% de los genes. La distribución de funciones GO en las proteínas activadas por la luz o por la mutación *carS* dentro de este 55%, y que se asignan a un valor de parámetro Fischer igual o menor a 0,05, se describen en las Figs. 2.12 y 2.13.



**Figura 2.12.** Distribución en categorías GO de los genes inducidos por luz a los que se pudo aplicar el análisis.

Los genes activados por luz se engloban en 21 categorías funcionales, que incluyen aspectos muy diversos del funcionamiento celular, desde regulación o señalización hasta metabolismo. Llama la atención por su volumen la categoría de procesos metabólicos de ácidos orgánicos. Se trata de un grupo muy extenso, ya que cubre todas las enzimas asociadas a reacciones químicas en las que participa un compuesto carbonado con un grupo ácido. Incluye por tanto numerosas reacciones del metabolismo basal de la célula, lo que sugiere un papel de la luz en la regulación de dicho metabolismo. Otras categorías con alta representación son más inciertas. Ese es el caso de la categoría “Procesos celulares unicelulares”, que abarca proteínas implicadas en reacciones químicas o rutas, tanto anabólicas como catabólicas, por la que organismos unicelulares transforman sustancias químicas.



**Figura 2.13.** Distribución de las categorías GO de los genes activados en el mutante *carS* a los que se pudo aplicar el análisis.

En el caso del efecto activador de la mutación *carS* (Fig. 2.13), los genes se distribuyen en 9 categorías, un número mucho menor que en la activación por la luz (Fig. 2.12). La mayoría de estas categorías están relacionadas con funciones metabólicas, y un número menor con distintos tipos de respuesta. La comparación de los dos juegos de categorías indica que la proteína CarS tiene un rango de influencia en la célula más limitado que la luz, aunque muchos de los genes que controla están regulados también por la luz.

La información proporcionada por los análisis de categorías GO debe interpretarse con mucha cautela. Por un lado, la mayoría de los genes considerados muestran cambios pequeños en su expresión, por lo cual en muchos casos pueden ser efectos indirectos. Por otro lado, muchos genes escapan al procedimiento de categorización. Ese es el caso, por ejemplo, de los genes de la carotenogénesis, que no se encuentran en ninguna categorías GO. Los datos completos del análisis de categorías GO se describen en el Anexo 2.

## 2.11. Genes de estrés fuertemente influidos por la luz y la mutación *carS*

Entre los genes cuya expresión se ve más fuertemente influida por la luz o por la mutación *carS* figuran algunos genes relacionados con distintos aspectos de los mecanismos celulares de respuesta a condiciones de estrés (Tabla 2.7).

**Tabla 2.7. Efecto de la luz y la mutación del gen *carS* sobre la expresión de cuatro genes relacionados con respuestas a estrés.**

Genes implicados en estrés	Identidad	Incremento de expresión en luz	Incremento de expresión en el mutante <i>carS</i>	Incremento de expresión en luz en el mutante <i>carS</i>
Flavin-containing amine oxidasedehydrogenase	FFUJ_09119	452,0	235,8	2,1
Regulador de sensibilidad a drogas Rds1	FFUJ_09320	291,4	125,4	4,5
Alcohol DHasa	FFUJ_10321	107,5	334,2	2,2
Prot. de resistencia a peróxido de hidrógeno orgánico	FFUJ_01993	55,7	35,6	3,0

El gen FFUJ\_09119 codifica para una presunta oxidasa-deshidrogenasa de amina que lleva flavina. A esta familia pertenecen enzimas con distintas funciones, con frecuencia asociadas a estrés. Entre ellas se encuentran las poliamina oxidasas, que participan en el catabolismo de las poliaminas, compuestos policatiónicos que desempeñan funciones en el mantenimiento y estructura de distintos componentes celulares en las respuestas a estrés (Liu et al., 2015). También pertenecen a esta familia las monoamina oxidasas, implicadas en la generación de estrés oxidativo en mamíferos (Maher y Davis, 1995).

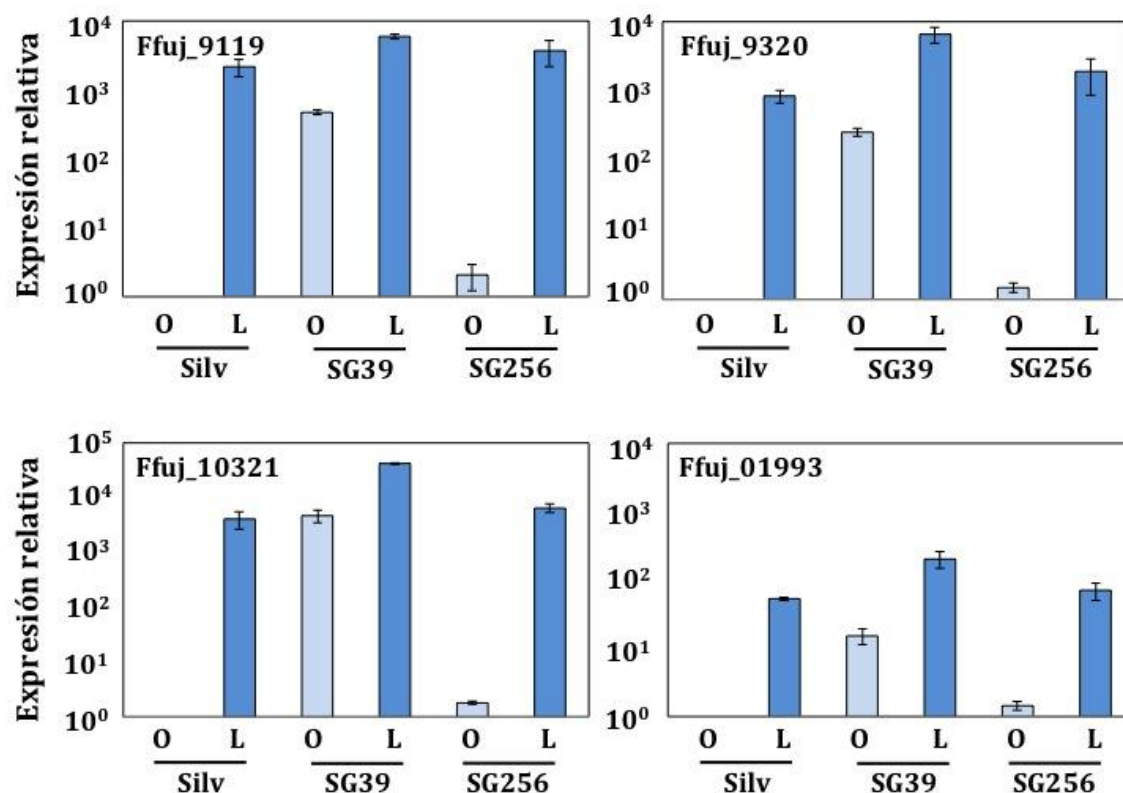
El gen FFUJ\_09320 de *F. fujikuroi* es homólogo a un factor de transcripción llamado Rds1 (de “Regulator of Drug Sensibility”). Rds1 es una proteína con un dedo de zinc que contiene un motivo binuclear  $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$  de unión a ADN, característico de un tipo de factores de transcripción exclusivos de hongos. Los mutantes de *S. cerevisiae* afectados en este gen son sensibles a cicloheximida (Akache y Turcotte 2002). Por otro lado, el promotor de gen *rds1* en *Schizosaccharomyces pombe* tiene dianas para el factor de transcripción Fep1, que está implicado en la respuesta a los cambios en los niveles de hierro (Rustici et al. 2007).



El gen FFUJ\_10321 es homólogo al gen *bli-4* de *N. crassa*, que debe su nombre (de “blue light-induced”) a su inducción por luz azul. FFUJ\_10321 codifica una retinol deshidrogenasa con un 78% de identidad con Bli-4, la cual tiene homología con las alcohol deshidrogenasas de cadena corta. Estas enzimas convierten el retinol a retinal y están localizadas en la membranas mitocondriales (Bruchez et al. 1996).

Los peróxidos orgánicos son subproductos generados por el estrés oxidativo, que pueden dañar componentes esenciales del funcionamiento celular. El gen FFUJ\_01993 codifica una proteína con un dominio de la subfamilia de las peroxiredoxinas, como los que se encuentran en las proteínas de tipo OsmC u Ohr de *E. coli*. Las peroxiredoxinas están implicadas en la defensa frente a los peróxidos tóxicos. Algunas peroxidases, como las Ohr, están implicadas en virulencia, pero no está claro para el caso de las de tipo OsmC. Estas últimas no se inducen por estrés oxidativo sino por diferentes reguladores de respuesta a estrés general (Dubbs y Mongkolsuk, 2007).

Los datos de RNA-seq mostrados en la tabla 2.7 fueron esencialmente corroborados por análisis de los niveles de ARNm mediante RT-PCR (Fig. 2.14). Los cuatro genes analizados muestran una fuerte inducción por luz en las estirpes silvestre y complementante, y una desregulación en la oscuridad en el mutante *carS*. Como única diferencia relevante, los datos de RT-PCR encuentran una desregulación para el gen Ffuj\_01993 en el mutante *carS* no detectado en los datos de RNA-seq.



**Figura 2.14. Efecto de la luz en la expresión de los genes descritos en la Tabla 2.7.** Los micelios se cultivaron 3 días en matraces en agitación en oscuridad, se transfirieron a cajas de Petri, donde se iluminaron en su caso con luz blanca durante una hora. Como control endógeno se usó la muestra de la estirpe silvestre en oscuridad. Los niveles de ARNm se determinaron por RT-PCR.

Los datos de RNA-seq revelaron también un papel de la luz y la proteína CarS en la regulación de genes de catalasas. Debido a que el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se describe en el capítulo 3, los efectos regulatorios que ejercen la luz y la mutación en el gen *carS* se tratan en detalle en dicho capítulo.

## **V. CAPÍTULO 3**



## V. CAPITULO 3: RELACIÓN DE LA CAROTENOGÉNESIS Y EL GEN *carS* CON LA REGULACIÓN POR LUZ Y ESTRÉS

En este capítulo se estudia la regulación de la expresión de *carS* como posible fuente de información sobre su función en la célula. Para ello se ha investigado el efecto de distintas condiciones ambientales sobre sus niveles de ARNm y en algunos casos de proteína, y se ha correlacionado con la síntesis de carotenoides y con la expresión del cluster *car* (representado por los genes *carRA* y *carB*), como uno de sus principales objetivos regulatorios. Las condiciones estudiadas son la luz, la disponibilidad de nitrógeno, el estrés térmico y el estrés oxidativo causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para ello se ha utilizado la estirpe silvestre, el mutante *carS* SG39 y, en algunos casos, el complementante SG256.

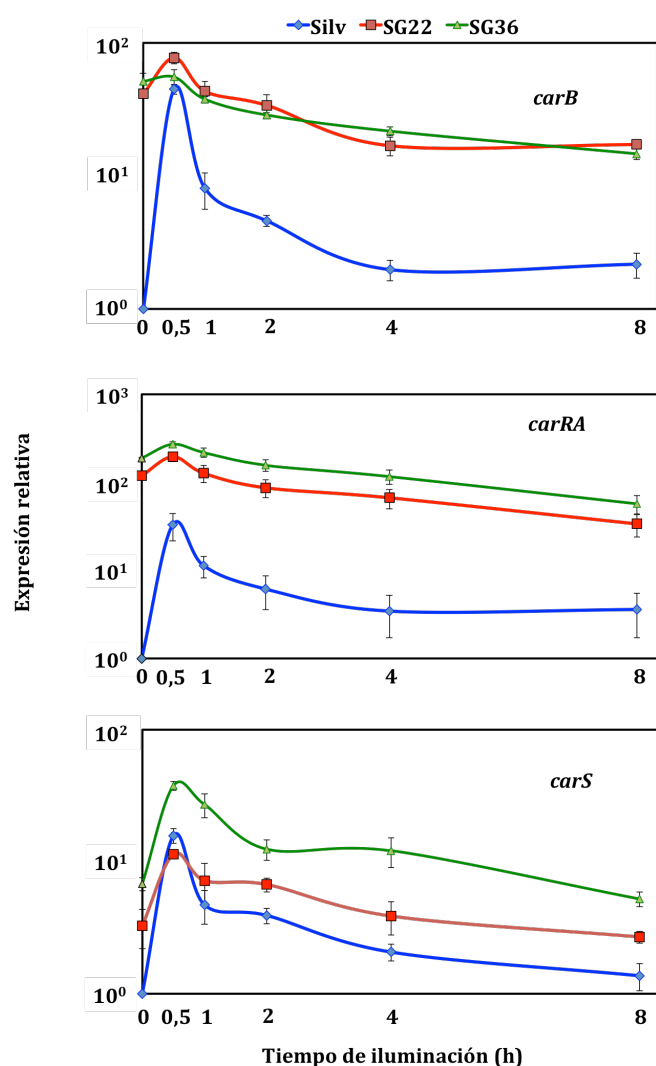
### 3.1. Regulación por luz

Como ya se ha descrito en la introducción, la luz es uno de los agentes ambientales que más influyen sobre la síntesis de carotenoides en hongos, normalmente estimulando la expresión de los genes para las enzimas de la ruta. Resultados anteriores en *F. fujikuroi* muestran que la exposición a la luz de un cultivo previamente incubado en oscuridad produce un fuerte incremento en la expresión de los genes del cluster *car*, alcanzando su máximo en una hora (Prado et al., 2004, Thewes et al., 2005, Prado-Cabrero *et al.* 2007). Se ha descrito también que la luz ejerce un efecto activador más moderado en la expresión del gen *carS* (Rodríguez-Ortíz et al., 2013).

#### 3.1.1. Efecto de la luz en cultivos líquidos en agitación

Se dispone de diferentes mutantes *carS*, cuyas mutaciones han sido identificadas por secuenciación de los correspondientes alelos (Rodríguez-Ortíz et al., 2013). Entre ellos figuran el mutante SG39, empleado en el análisis de RNA-seq descrito en el capítulo anterior, y los mutantes SG1, SG22 y SG36. Cuando se realizaron estos experimentos no se disponía aún de la estirpe complementante del mutante *carS* SG39. Para estudiar el efecto de la luz sobre la expresión del gen *carS*, así como de los genes *carRA* y *carB*, se cultivaron la estirpe silvestre y los mutantes SG22

y SG36 durante 3 días en oscuridad en medio mínimo DG líquido y posteriormente se iluminaron durante distintos tiempos (Fig. 3.1).

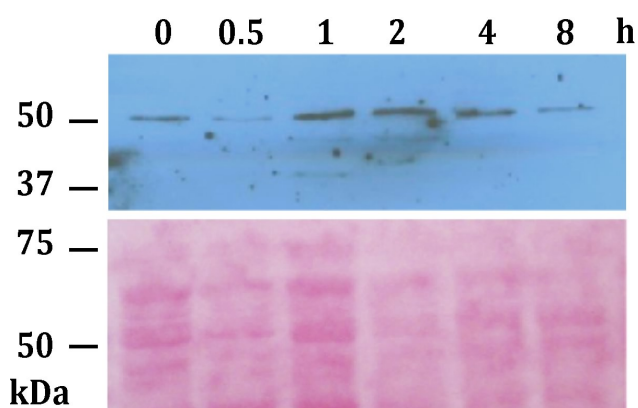


**Figura 3.1. Cinética de expresión de los genes *carB*, *carRA* y *carS* tras exposición a luz blanca.** La estirpe silvestre (trazo azul) y los mutantes *carS* SG22 (trazo rojo) y SG36 (trazo verde) se cultivaron en oscuridad durante 3 días en matraces en agitación y se iluminaron el tiempo indicado en abscisas. Los niveles de ARNm se determinaron por RT-PCR.

En las condiciones experimentales empleadas, la fotoinducción de los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB* fue más rápida que en datos publicados anteriormente, alcanzando su valor máximo a los 30 min de iluminación, y bajando posteriormente. Como se esperaba, los niveles de ARNm de ambos genes estructurales fueron mucho mayores en la oscuridad en los mutantes *carS* que en la estirpe silvestre. Aunque en menor medida, se observó también una leve fotoinducción en estos mutantes, corroborando datos anteriores (Prado-Cabrero et al., 2007). Dicha fotoinducción fue también transitoria, pero en este caso las cantidades de los transcritos alcanzaron niveles inferiores a los que tenían los dos mutantes antes de ser iluminados.

El gen *carS* mostró un patrón de regulación muy similar al de los genes *carRA* y *carB*, salvo que sus niveles de inducción fueron algo menores. Dicha fotoinducción es comparable a los niveles publicados (Rodríguez-Ortiz et al., 2013), a pesar de tratarse de diferentes condiciones de cultivo. Los niveles de ARNm de *carS* en la oscuridad fueron también algo mayores en los propios mutantes *carS*, indicando una autoregulación del gen.

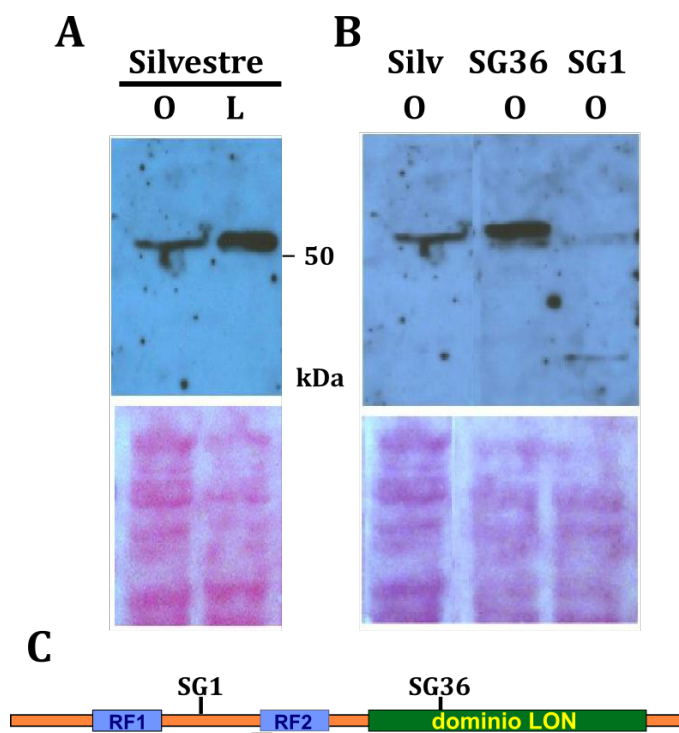
A fin de comprobar si el aumento en los niveles de ARNm del gen *carS* da lugar a niveles mayores de proteína CarS, se realizó un experimento de *western* con anticuerpo anti-CarS en las mismas condiciones (Fig. 3.2). Los resultados mostraron un incremento en la cantidad de proteína CarS, que teniendo en cuenta las cantidades de proteína en los carriles del gel, fue especialmente significativa alrededor de las dos horas de iluminación. Los niveles de proteína CarS bajaron con exposiciones más prolongadas a la luz.



**Figura 3.2. Western de la cinética de la cantidad de proteína CarS tras inducir los cultivos por luz blanca.** La estirpe silvestre se cultivó en oscuridad durante 3 días en matraces en agitación y se iluminó durante los tiempos indicados. Abajo se muestra, como control de carga, la tinción con rojo Ponceau de las proteínas transferidas al filtro del *western*.

Para comprobar si los niveles de la proteína CarS aumentan también en los mutantes *carS* la oscuridad, se cultivaron la estirpes silvestre y los mutantes SG36 y SG1 durante 3 días en oscuridad en las mismas condiciones de cultivo y se iluminaron durante 60 min. El mutante SG1 se incluyó en el análisis como control de fiabilidad en la detección de CarS, ya que posee una mutación de fin de mensaje prematuro anterior al epítipo que reconoce el anticuerpo, por lo que se espera que carezca de proteína CarS. Además, se repitió en paralelo la exposición del micelio silvestre durante una hora en la luz. Una vez realizadas las incubaciones, se obtuvieron

extractos crudos de las muestras y se utilizaron en un experimento de *western* frente al anticuerpo anti-CarS (Fig. 3.3).



**Figura 3.3. Western del efecto de la luz y de la mutación *carS* en los niveles de proteína CarS.** La estirpe silvestre (Silv) y los mutantes *carS* SG36 y SG1 se cultivaron durante tres días en matraces en agitación en oscuridad.

**A.** La estirpe silvestre se mantuvo en oscuridad (O) o se iluminó 1 h (L).

**B.** Las estirpes indicadas se mantuvieron en oscuridad (O).

**C.** Esquema de la proteína CarS indicando las posiciones de las mutaciones puntuales de SG1 y SG36. En rojo está marcado el epítipo reconocido por el anticuerpo anti-CarS.

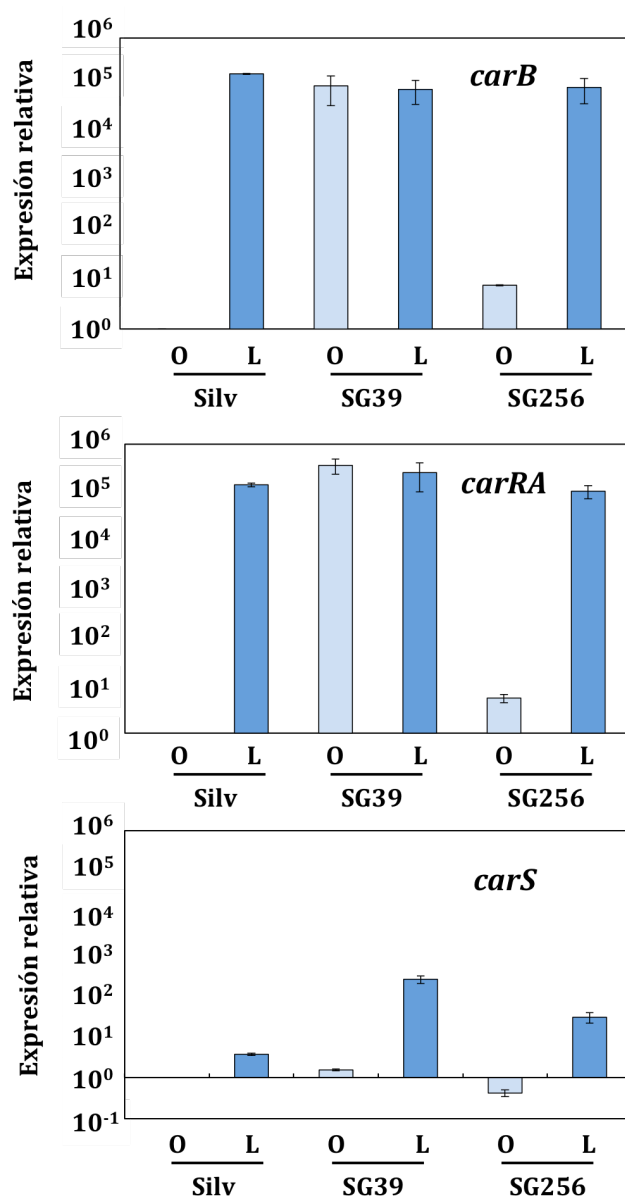
Los resultados confirmaron la presencia de mayor cantidad de proteína CarS en la estirpe silvestre tras la iluminación que en la oscuridad. Por otra parte, los niveles de proteína CarS fueron mayores en el mutante SG36 que en la estirpe silvestre, sugiriendo que el gen *carS* regula negativamente su propia expresión. En el carril del mutante SG1 no se detectó proteína CarS, confirmando la especificidad del anticuerpo anti-CarS.

### 3.1.2. Efecto de la iluminación en cultivos líquidos estáticos

En experimentos publicados anteriormente, la iluminación se realizó en cultivos líquidos estáticos. En estas condiciones, la inducción es mucho más fuerte y el valor máximo se alcanza aproximadamente tras una hora de iluminación (Prado et al., 2004, Thewes et al., 2005, Prado-Cabrero et al. 2007). Por ello, los siguientes experimentos se realizaron iluminando una capa delgada de cultivo estático en una caja de Petri. Debido a la disponibilidad de la estirpe complementante SG256 (ver



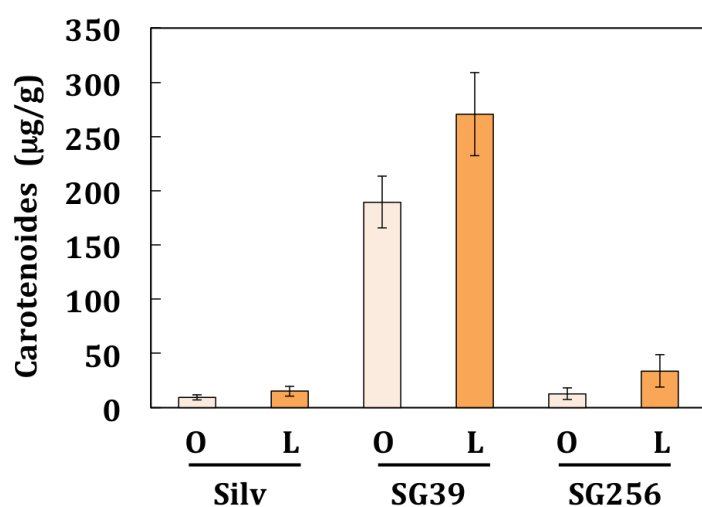
capítulo 2), dichos experimentos se realizaron con la estirpe silvestre y SG256 como controles del mutante *carS* SG39.



**Figura 3.4. Efecto de la luz sobre la expresión de los genes *carRA*, *carB* y *carS*.** Los micelios se cultivaron 3 días en matraces en agitación en oscuridad, se transfirieron a cajas de Petri, donde se iluminaron en su caso con luz blanca durante una hora. Como control endógeno se usó la muestra de la estirpe silvestre en oscuridad. Los niveles de ARNm se determinaron por RT-PCR.

Por tanto, los micelios de las tres estirpes se cultivaron durante 3 días en medio mínimo DG-a 30°C en agitación y en oscuridad, y a continuación se transfirieron a cajas de Petri para su exposición a la luz o su incubación en paralelo en oscuridad. Una parte del micelio se usó para cuantificar la expresión de los genes *car* analizados en la sección anterior (Figura 3.4), y otra se usó para cuantificar el contenido en carotenoides (Figura 3.5).

En estas condiciones experimentales, la fotoinducción de los genes *carRA* y *carB* fue mucho más elevada (Fig. 3.4) que en el experimento descrito en la Fig. 3.1. Por el contrario, no se detectó fotoinducción en el mutante *carS*, en el que se encontraron cantidades de ARNm igualmente elevadas para los dos genes tanto en oscuridad como tras la hora de iluminación. La enorme diferencia observada entre oscuridad y luz en la estirpe silvestre ( $10^5$  veces) se debe muy probablemente a que las cantidades de ARNm en la oscuridad fueron mucho más bajas que en el experimento de la Fig. 3.1, ya que los niveles tras una hora de iluminación fueron similares a los que se encuentran en el mutante *carS*. En el caso de la estirpe SG256, se recuperó el patrón de expresión silvestre, aunque los niveles de transcrito en la oscuridad fueron ligeramente superiores. Por su parte, las cantidades de ARNm del gen *carS* mostraron una fotoinducción mucho más leve, aunque alcanzó aproximadamente dos órdenes de magnitud en el mutante *carS*, un resultado que contrasta con la ausencia de fotoinducción observada para los genes *carRA* y *carS* en la misma estirpe.



**Figura 3.5. Efecto de la luz y la mutación *carS* sobre el contenido en carotenoides.**

Los micelios de la estirpe silvestre, el mutante *carS* SG39 y el complementante SG256 se incubaron en matraces en agitación en oscuridad durante 3 días tras los cuáles se pasaron a placas de Petri y se iluminaron durante 1 hora (L) o se mantuvieron en oscuridad (O).

Como se esperaba, los contenidos de carotenoides fueron muy reducidos en las muestras de la estirpe silvestre y SG256 y muy elevados en las muestras del mutante *carS*. Aunque la medida se realizó una hora después de iluminar, por lo que hubo poco tiempo para la respuesta biosintética, se nota ya un leve incremento en el contenido en carotenoides de las tres estirpes en la luz en comparación con la oscuridad. En la

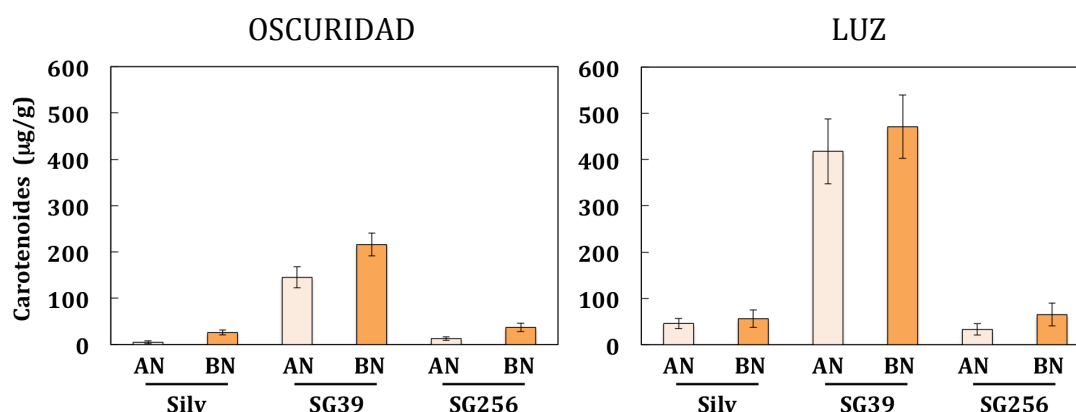
sección siguiente, se realizaron medidas similares con 24 horas de tiempo tras la iluminación, que permiten comparar un tiempo de respuesta corto con uno largo.

### 3.2. Regulación por nitrógeno

Además de la luz, la disponibilidad de nitrógeno ejerce una notable influencia sobre la síntesis de carotenoides, siendo ésta estimulada por la escasez de este nutriente (Rodríguez-Ortiz et al., 2012). En experimentos anteriores, este autor estudió el efecto de la ausencia de nitrógeno mediante experimentos de transferencia, por los cuales micelio previamente incubado en medio con exceso de nitrógeno era filtrado, lavado con agua y resuspendido en una solución de glucosa, dando lugar a una activación de la expresión de los genes *carRA* y *carB* y a un incremento en la síntesis de carotenoides.

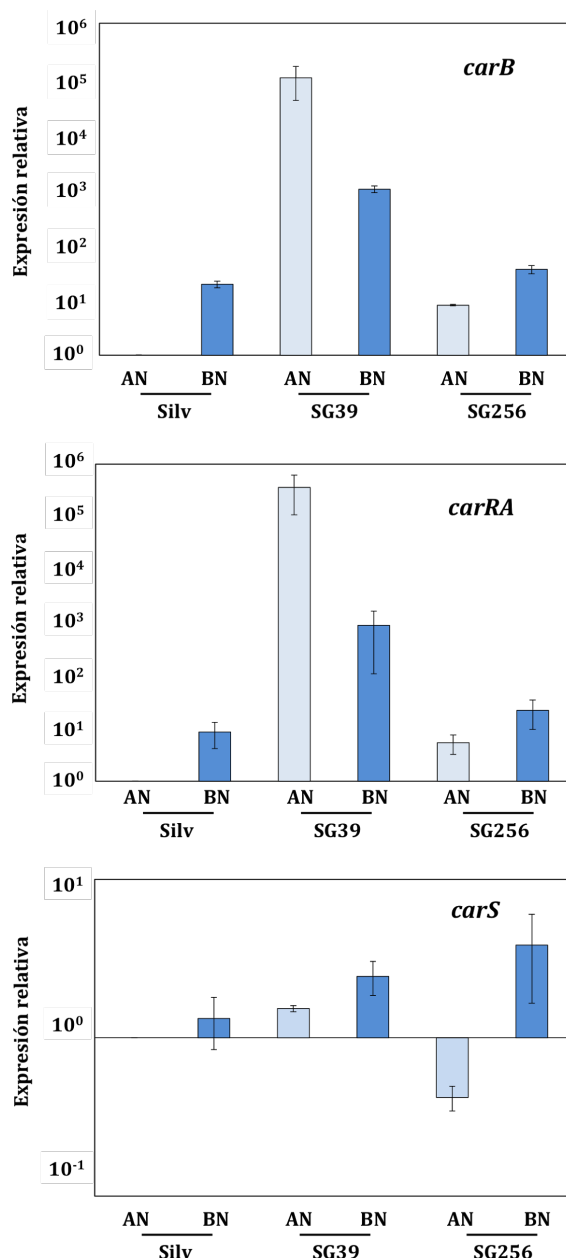
A fin de averiguar si la regulación por nitrógeno se mantiene en otras condiciones de cultivo, y si ésta se extiende también al gen *carS*, se realizaron incubaciones en medio con exceso de nitrógeno (medio AN, de alto nitrógeno) y en medio con una concentración limitante de nitrógeno (medio BN), utilizando para ello medio mínimo con  $\text{NaNO}_3$ . La concentración limitante se calculó a partir de experimentos previos, basados en el efecto de la disponibilidad de nitrógeno sobre la síntesis de giberelinas (Candau et al., 1992). Los cultivos se mantuvieron 3 días en oscuridad en agitación y se pasaron una hora a cultivo estático para su eventual exposición a la luz durante una hora. En el caso de medición de carotenoides, los cultivos se mantuvieron 24 horas adicionales en oscuridad tras el pulso de luz, haciendo lo mismo con los cultivos no iluminados. Posteriormente, los micelios se sometieron a los mismos análisis descritos en la sección 3.1.2, determinando los contenidos en carotenoides (Fig. 3.6) y los niveles de ARNm de los genes *carRA*, *carB* y *carS* (Fig. 3.7).

Los datos de los carotenoides (Fig. 3.6) muestran un contenido más alto en oscuridad en los cultivos en condiciones limitante de nitrógeno (BN) que en exceso de nitrógeno (BN), siendo las diferencias mucho menores tras la exposición de una hora a la luz. En relación a los datos mostrados en la Fig. 3.5, se puede apreciar la diferencia entre luz y oscuridad en la estirpe silvestre y en el complementante SG256 es mucho mayor que en el experimento anterior, debido al mayor tiempo de respuesta tras la exposición de una hora a la luz.



**Figura 3.6. Efecto de la concentración de nitrógeno sobre la síntesis de carotenoides.** El contenido en carotenoides de la estirpe silvestre, mutante *carS* y complementante se midió en micelios cultivados en oscuridad durante 4 días con dos concentraciones de nitrato. AN: 3g/L NaNO<sub>3</sub>, BN: 0,625g/L NaNO<sub>3</sub>. Las muestras del gráfico derecho se iluminaron durante 1 hora al terminar el tercer día.

Las diferencias en carotenoides en los medios con alto y bajo nitrógeno en la estirpe silvestre se explican por la mayor cantidad de ARNm de los genes *carRA* y *carB* presentes en los correspondientes micelios (Fig. 3.7). Aunque se mantuvo la tendencia, las diferencias fueron menores para el complementante SG256. Sin embargo, la escasez de nitrógeno produjo el efecto opuesto en el mutante *carS*, con bajadas en las cantidades de los transcritos próximas al 50%. Este dato sugiere que la activación transcripcional por escasez de nitrógeno de los genes *carRA* y *carB* requiere, al menos parcialmente, la función de la proteína CarS.



**Figura 3.7. Efecto de la concentración del nitrógeno sobre la expresión de los genes *carRA*, *carB* y *carS* en oscuridad.** La estirpes silvestre (Silv), SG39 y SG256 se cultivaron en oscuridad durante 3 días en medio DG. AN:  $\text{NaNO}_3$  3g/l, BN:  $\text{NaNO}_3$  0,625 g/l. Los niveles de ARNm se determinaron por RT-PCR.

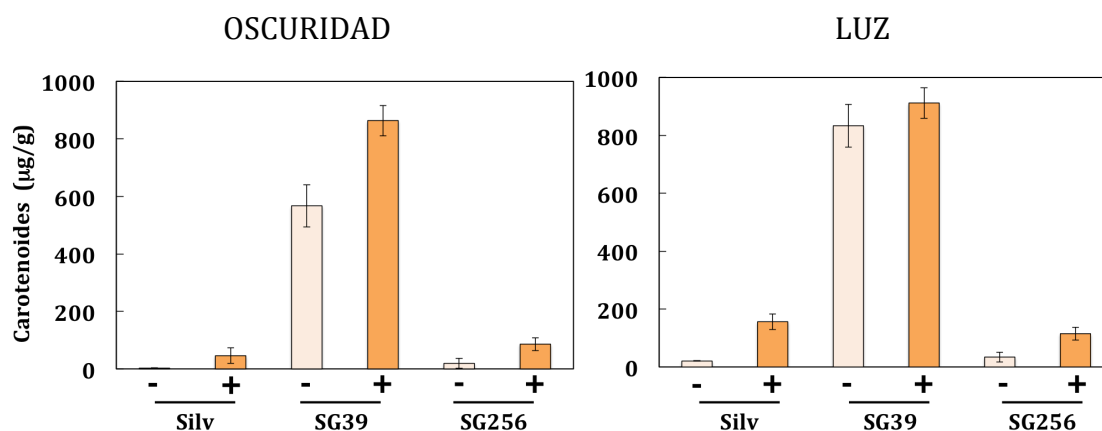
En oscuridad, independientemente de la cantidad de nitrógeno en el medio, la expresión de *carS* no sufrió cambios importantes, si bien en las tres estirpes analizadas la cantidad de transcrito *carS* fue mayor en escasez de nitrógeno.

### 3.3. Regulación por choque térmico.

Cuando los microorganismos se exponen a temperaturas elevadas, alteran sus patrones de expresión génica y sintetizan juegos específicos de proteínas (Killen et al., 1988). Con ello se pretende aliviar las consecuencias del estrés, que afecta en gran

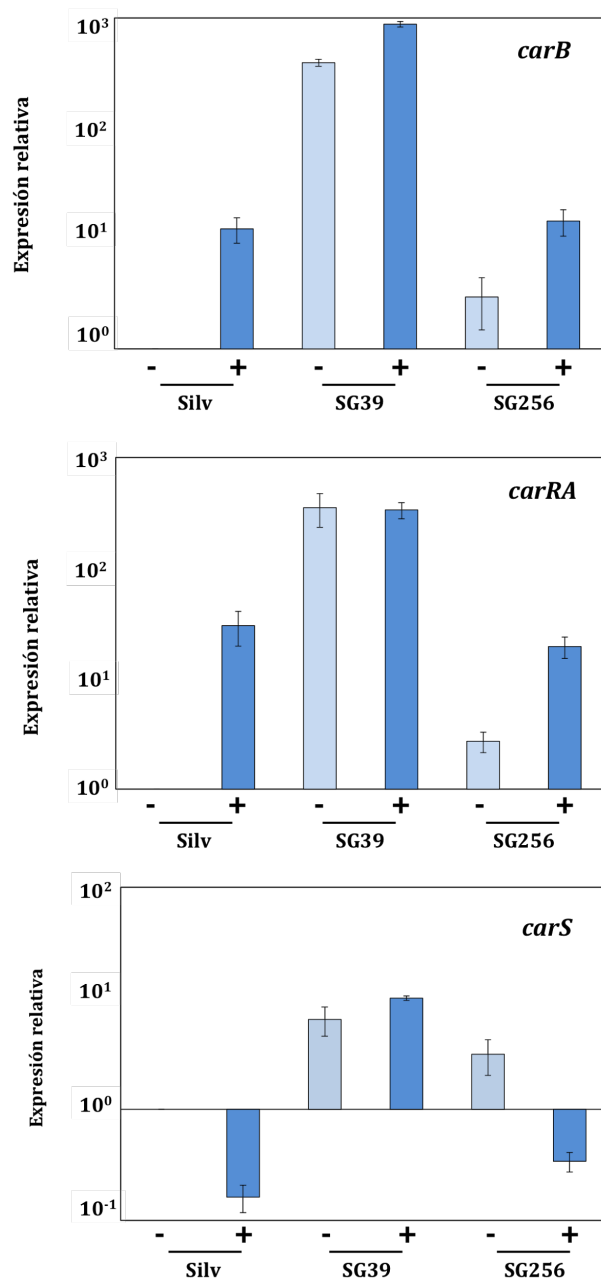
medida a la estructura de las proteínas. Estos cambios se conocen globalmente como respuesta a choque térmico y las proteínas sintetizadas se conocen como “heat-shock proteins” o HSP (Killen et al., 1988, Gao et al. 2004, Guisbert, et al., 2004).

En *F.fujikuroi* se ha descrito que los genes *carB* y *carO* aumentan sensiblemente su expresión en oscuridad en respuesta a un choque térmico de 42°C (Prado et al, 2004, Estrada y Ávalos, 2009), pero no se ha estudiado su efecto sobre la expresión de otros genes del *cluster*, como el gen *carRA*, o sobre la del propio gen *carS*. Con el objetivo de realizar este estudio, se cultivaron las estirpes utilizadas en la secciones 3.1.2 y 3.2 en las mismas condiciones descritas para los experimentos de regulación por luz y por hambre de nitrógeno, pero realizando en este caso un choque térmico. Tras tres días de cultivo en oscuridad a 30°C, el micelio se incubó durante una hora a 42°C en oscuridad. El mismo experimento se realizó en paralelo realizando el choque térmico durante una hora bajo luz blanca. A fin de dejar un tiempo de respuesta suficiente, el contenido de carotenoides se cuantificó 24 horas después del choque térmico (Figura 3.8).



**Figura 3.8. Efecto del choque térmico sobre el contenido de carotenoides en condiciones de luz y oscuridad.** Los micelios de las estirpes silvestre (Silv), mutante *carS* (SG39) y complementante (SG256) se incubaron 4 días a 30°C en oscuridad. En su caso, al final del tercer día se sometieron a choque térmico de 42°C durante 1h. El signo (-) indica ausencia de choque térmico y el signo (+) indica realización de choque térmico.

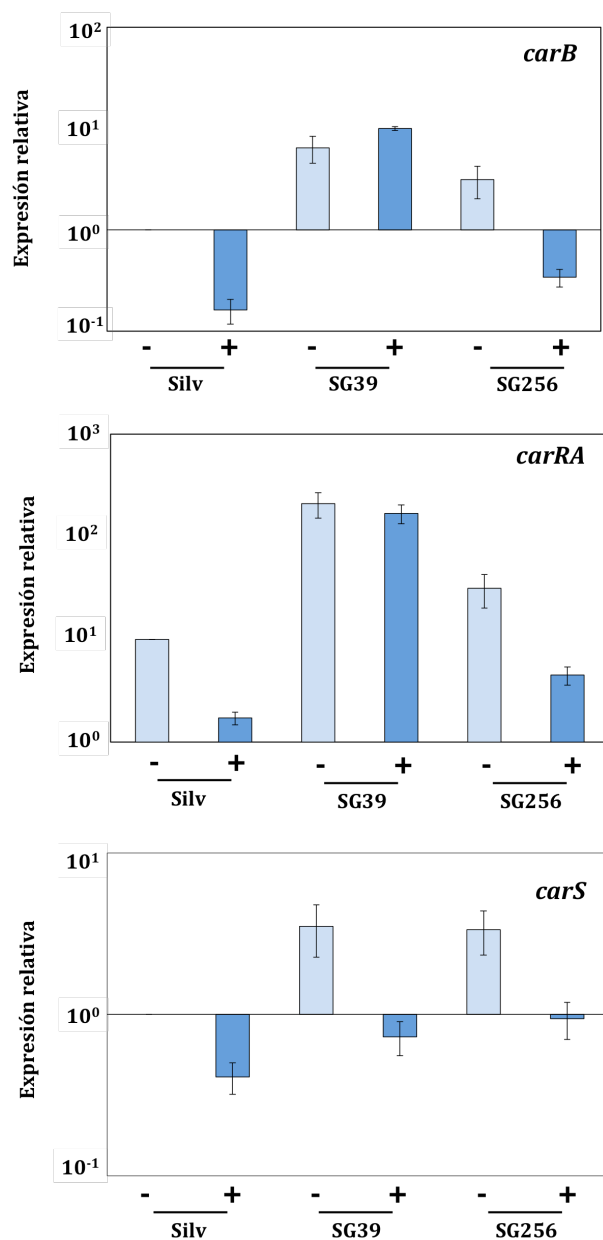
Tanto en oscuridad como en luz, el choque térmico incrementó sensiblemente la cantidad de carotenoides tanto en la estirpe silvestre y complementante como en el mutante *carS*, siendo la diferencia mucho más patente en las dos primeras estirpes.



**Figura 3.9. Efecto del choque térmico en oscuridad sobre la expresión de los genes *carRA*, *carB* y *carS*.** Los micelios de las estirpes silvestre (Silv), mutante *carS* (SG39) y complementante (SG256) se mantuvieron 3 días a 30°C en oscuridad y se sometieron a choque térmico de 42°C durante 1h. El signo (-) indica ausencia de choque térmico y el signo (+) indica realización de choque térmico. Los niveles de ARNm se determinaron por RT-PCR.

Las medidas de ARNm mediante RT-PCR confirmaron el fuerte aumento en los niveles para el gen *carB* en las estirpes silvestre y complementante tras el choque térmico (Fig. 3.9), y lo extendieron al gen *carRA*. Se observó sin embargo, un patrón opuesto de expresión del gen *carS*, que puede estar asociado al incremento en la expresión de los genes estructurales *carRA* y *carB*. Sin embargo, el choque térmico apenas tuvo consecuencias sobre los contenidos en transcritos de los tres genes en el mutante *carS*. Sorprendentemente, el patrón de expresión se invirtió para los genes *carRA* y *carB* en las estirpes silvestre y complementantes si el choque térmico se realiza en la luz (Fig. 3.10), mientras que los niveles siguieron inalterados en el

mutante *carS*. En el caso del propio gen *carS*, bajo luz no hubo diferencias importantes entre las tres estirpes, que acumularon menor cantidad de transcrito tras el choque térmico.



**Figura 3.10. Efecto del choque térmico en luz sobre la expresión de los genes *carRA*, *carB* y *carS*.** El experimento se realizó igual que en la Fig. 3.8, pero en este caso el choque térmico se realizó bajo luz blanca. El signo (-) indica ausencia de choque térmico y el signo (+) indica choque térmico. Los niveles de ARNm se determinaron por RT-PCR.

### 3.4. Regulación por estrés oxidativo producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

El metabolismo aerobio de la célula genera formas reactivas de oxígeno, o derivados, que pueden dañar muchos componentes celulares, y que son normalmente eliminadas por sistemas enzimáticos detoxificantes. El estrés oxidativo tiene lugar



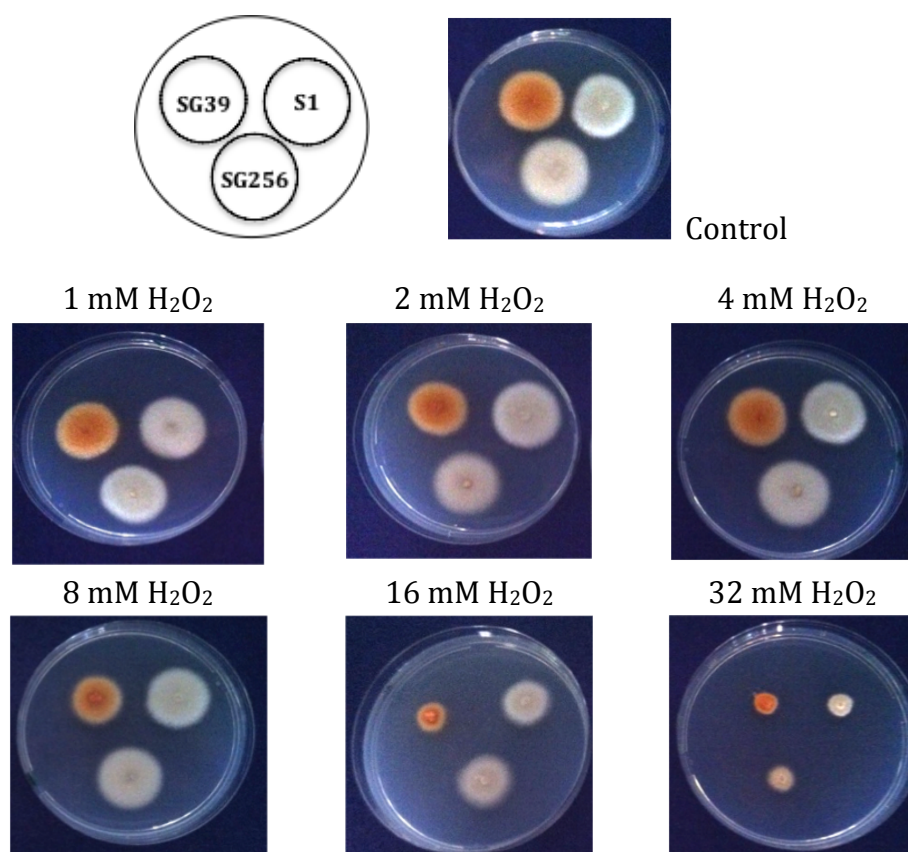
cuando se produce un desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno y su neutralización por los mecanismos antioxidantes (Kohen et al., 2002). En respuesta a estrés oxidativo, la célula activa rutas de señalización y factores específicos que inducen la expresión de proteínas antioxidantes, encargadas de restablecer los niveles redox intracelulares normales y de reparar los daños causados.

En esta sección se aborda el estudio del efecto del estrés oxidativo sobre la carotenogénesis y la regulación de los genes *carRA*, *carB* y *carS*, centrado en la exposición a  $H_2O_2$ , por dos motivos: (1) se atribuye a los carotenoides propiedades antioxidantes, y se ha acumulado gran cantidad de evidencia experimental en diferentes hongos que apuntan a un papel protector frente al estrés oxidativo en estos organismos (Avalos y Limón, 2015); y (2), en el análisis ARNseq descrito en el capítulo 2 de resultados de esta Tesis, entre los genes activados en mayor medida en el mutante *carS* figuran algunos para proteínas con posible actividad catalasa.

#### 3.4.1 Efecto del $H_2O_2$ sobre el crecimiento de *F. fujikuroi*

Con el objetivo de determinar concentraciones subtóxicas de  $H_2O_2$  sobre *F. fujikuroi* para su uso en experimentos posteriores, primero se cultivó la estirpe silvestre en distintas concentraciones de este agente oxidante en un cierto momento de desarrollo de los cultivos y se midió la biomasa de micelio tras el tratamiento. Para ello se realizaron cultivos en matraces durante 3 días en agitación, y se repartió el micelio resultante en cajas de Petri, a las que se añadió  $H_2O_2$  a distintas concentraciones, continuando el crecimiento durante 24 horas adicionales. Aunque las medidas de peso presentaron variación entre las réplicas, a 16 y 32 mM se empezó a producir una caída muy patente en el peso. A concentraciones iguales o inferiores a 8 mM de  $H_2O_2$  el cultivo mantuvo una biomasa similar a la del control.

El crecimiento se analizó también exponiendo las estirpes a  $H_2O_2$  durante todo el tiempo de cultivo. Para ello se hicieron trasplantes de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup> de micelio de cada estirpe a cajas con distintas concentraciones del agente oxidante y se incubaron durante 3 días, a 30°C en oscuridad (Fig. 3.11).

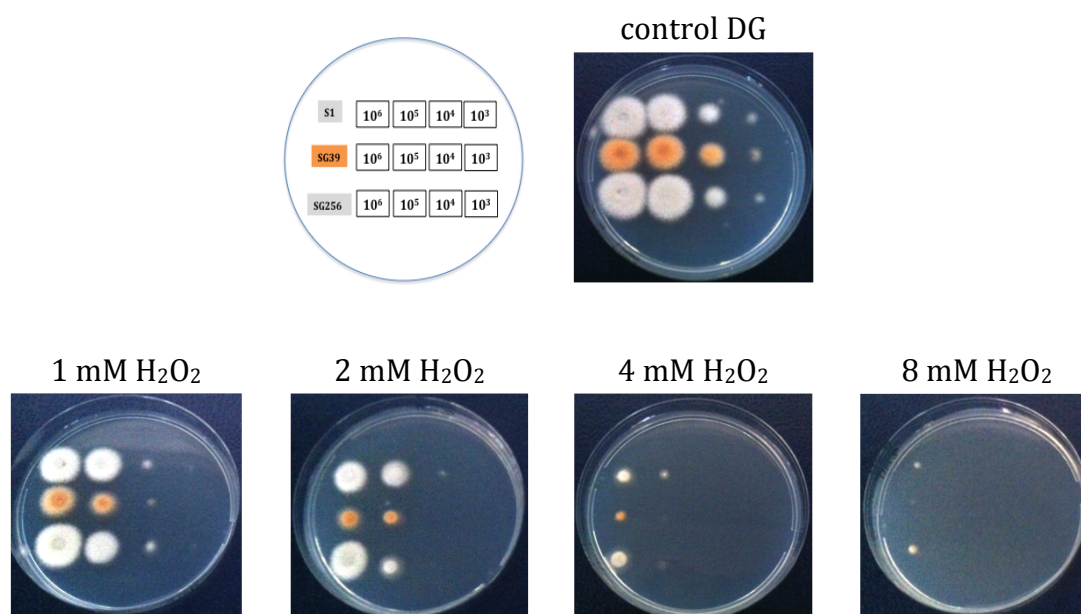


**Figura 3.11. Efecto de la concentración de  $H_2O_2$  sobre el crecimiento de colonias.** La estirpe silvestre (S1), la mutante *carS* y la complementante SG256 se cultivaron en medio mínimo DG durante 4 días en oscuridad; a continuación se hicieron trasplantes a medio mínimo DG suplementado con las concentraciones indicadas arriba y se incubaron durante 3 días.

De acuerdo con el diámetro de las colonias, el mutante *carS* mostró mayor sensibilidad a la presencia de  $H_2O_2$  que las estirpes silvestre y complementante, siendo la diferencia especialmente acusada a una concentración de 16 mM. A 32 mM las tres estirpes mostraron una sensibilidad similar.

La germinación de la espora es un punto especialmente sensible en el ciclo de vida de los hongos. A fin de ver el efecto del  $H_2O_2$  sobre la germinación, se sembraron gotas con un número de esporas decreciente, de  $10^6$  a  $10^3$ , en cajas de Petri con medio mínimo DG con diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  y se incubaron en oscuridad durante 3 días a 30°C (Fig. 3.12). Los resultados mostraron una sensibilidad mucho mayor de las esporas que con el micelio (Fig. 3.11). Así, mientras que en presencia de 8 mM  $H_2O_2$  apenas hubo diferencia de crecimiento de micelio las estirpes respecto al control sin  $H_2O_2$ , el desarrollo a partir de las esporas fue casi inexistente a esta concentración. Respecto a la comparación entre las tres estirpes, el mutante *carS*

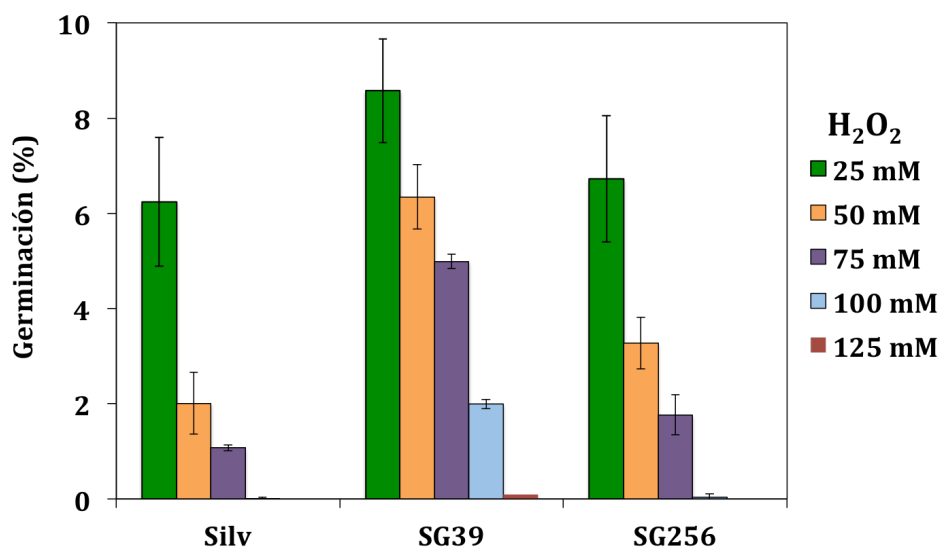
mostró también más sensibilidad en estas condiciones experimentales, siendo la diferencia especialmente patente a una concentración de 2 mM de  $H_2O_2$ .



**Figura 3.12. Efecto de la concentración creciente de  $H_2O_2$  sobre distintas cantidades de esporas.** Se sembraron gotas que contenían entre  $10^3$  a  $10^6$  de esporas de la estirpe silvestre, mutante *carS* y complementante SG256 en medio mínimo DG con distintas concentraciones de  $H_2O_2$  durante 3 días.

Este resultado confirma que el mutante *carS* SG39 es menos tolerante al  $H_2O_2$  que la estirpe silvestre, y que esta diferencia es causada por la ausencia del gen *carS*, ya que la estirpe complementante recupera el nivel de tolerancia silvestre.

Para comprobar si el menor crecimiento del mutante *carS* al sembrar esporas en medio con  $H_2O_2$  se debe a un efecto directo sobre la germinación, se analizó la capacidad de desarrollo de esporas previamente expuestas al agente oxidante, estando éste ausente en el momento de la germinación. Para ello se expusieron las esporas durante 30 min a distintas concentraciones de  $H_2O_2$  en agitación y en oscuridad, y se sembraron diluciones de estas suspensiones de esporas en cajas de Petri con distintas concentraciones de  $H_2O_2$ , contándose tras el tiempo de incubación necesario el número de colonias desarrolladas. Los datos se representaron tomando como referencia el control sin tratar de cada estirpe (Figura 3.13).

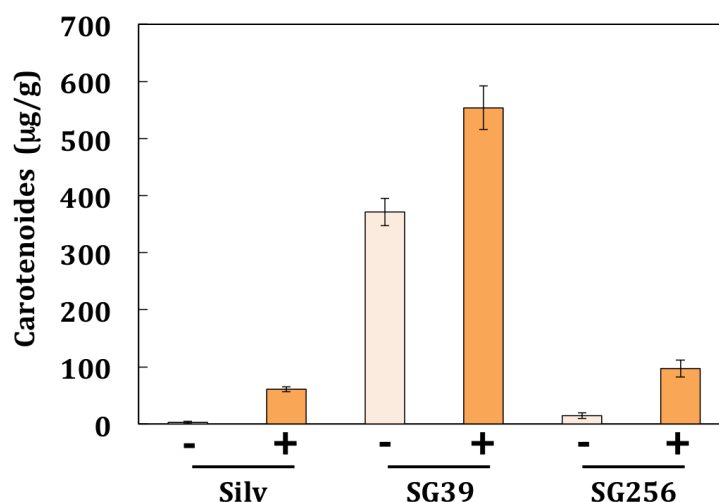


**Figura 3.13. Germinación de las estirpes en medio DG.** Las esporas se incubaron con distintas concentraciones de  $H_2O_2$  en agitación durante 30 min y en oscuridad, y se dejaron germinar en ausencia del agente oxidante.

En este caso, a diferencia de lo observado en los experimentos anteriores, las esporas del mutante *carS* fueron capaces de desarrollar un número mayor de colonias en presencia de concentraciones subtóxicas de  $H_2O_2$  que las esporas de las estirpes silvestre y complementante. De este experimento se concluye que las esporas del mutante *carS* son más tolerantes que las estirpes control a una exposición temporal al  $H_2O_2$ , pero son más sensibles a la propia germinación en presencia del agente oxidante.

#### 3.4.2. Efecto del $H_2O_2$ sobre la carotenogénesis de *F. fujikuroi*

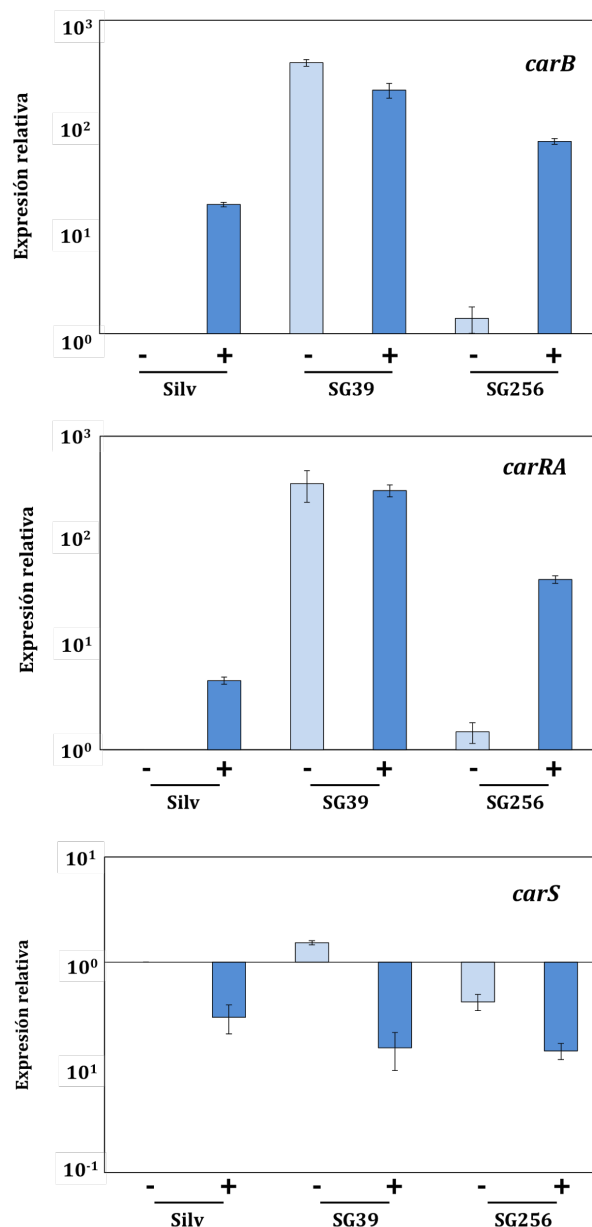
Del mismo modo que se procedió anteriormente para el estudio de los efectos de la luz, la escasez de nitrógeno y el choque térmico, se analizó el efecto del estrés oxidativo causado por  $H_2O_2$  sobre la carotenogénesis, tanto a nivel de producción de carotenoides como de regulación de los genes estructurales *carRA* y *carB* y del gen regulador *carS*. El procedimiento fue el mismo seguido en los tratamientos anteriores, con una hora de exposición a  $H_2O_2$ , pero en el caso de la medida de carotenoides, los cultivos permanecieron 24 en la condición de estrés.



**Figura 3.14. Efecto del  $H_2O_2$  sobre el contenido de carotenoides de las estirpes silvestre, mutante *carS* y complementante en condiciones de oscuridad.** Los micelios de las estirpes silvestre (Silv), mutante *carS* (SG39) y complementante (SG256) se incubaron 4 días a 30°C en oscuridad. En su caso, al final del tercer día se añadió  $H_2O_2$  a una concentración final de 16 mM. El signo (+) indica la exposición a 16 mM de  $H_2O_2$ , y el signo (-) la ausencia de exposición.

Las tres estirpes acumularon mayor cantidad de carotenoides en presencia de  $H_2O_2$  (Fig. 3.14). La diferencia fue proporcionalmente más significativa en el caso de las estirpes silvestre y complementante, en las que el efecto estimulador fue comparable al producido por la luz (ver Fig. 3.6).

Para comprobar si la estimulación en la síntesis de carotenoides producida por la exposición a  $H_2O_2$  es llevada a cabo a nivel de transcripción, se cuantificaron los niveles de ARNm de los genes *carRA*, *carB* y *carS* en los micelios una hora después de la adición de  $H_2O_2$ , así como en cultivos control sin la adición. Para ello, los cultivos líquidos incubados tres días en agitación en oscuridad se expusieron durante una hora a 16 mM  $H_2O_2$  y a continuación se recogieron los micelios por filtración para su análisis. Los niveles de transcrito de los tres genes en las estirpes silvestre, *carS* y complementante se muestran en la figura 3.15.



**Figura 3.15.** Efecto de la exposición a  $H_2O_2$  en la expresión de los genes *carRA*, *carB* y *carS*. El signo (-) representa la muestra en oscuridad sin  $H_2O_2$ . El signo (+) representa la muestra incubada con  $H_2O_2$  16 mM durante 1 h. Los niveles de ARNm se determinaron por RT-PCR.

La adición de  $H_2O_2$  incrementó notablemente los niveles de transcrito para los genes *carRA* y *carB* en las estirpes silvestre y complementante, mientras que no se observó cambio significativo en dichos niveles en el mutante *carS* (Fig. 3.15). Sin embargo, los niveles de ARNm del gen *carS* sufrieron un descenso por efecto del  $H_2O_2$  en las tres estirpes. Este patrón opuesto de regulación del gen *carS* frente a los genes estructurales *carRA* y *carB* es muy similar al observado por efecto del choque térmico en oscuridad (Fig. 3.9), lo que sugiere que la respuesta de la carotenogénesis a ambos tipos de estrés se lleva a cabo a través del mismo mecanismo molecular.

### 3.5. Regulación de genes con dominios catalasa por luz y por CarS

Las catalasas constituyen una familia de enzimas oxidoreductasas que descompone el  $H_2O_2$  en oxígeno y agua. La eliminación de  $H_2O_2$  evita nuevas reacciones de este compuesto para generar iones hidroxilo y oxígeno singlete, especies de oxígenos altamente reactivas. Son por tanto enzimas detoxificadoras, que desempeñan un papel importante en la remediación del estrés oxidativo en la célula.

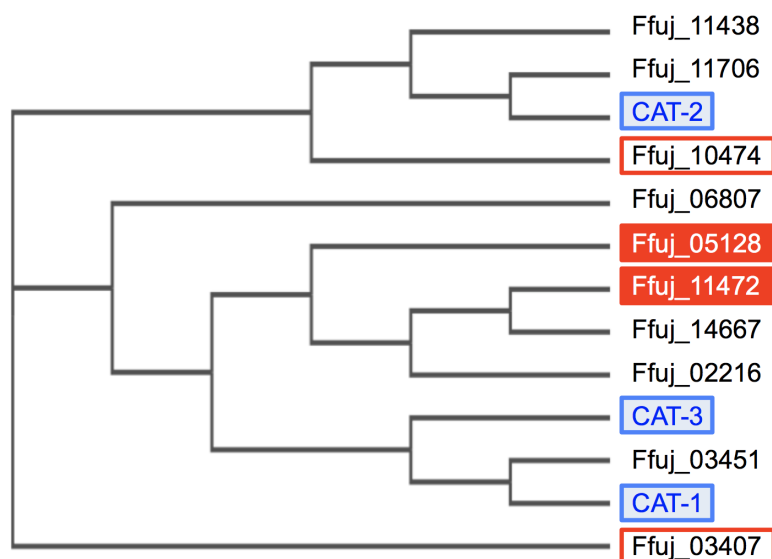
Las catalasas se pueden dividir en tres grupos (Murshudov et al., 2002):

- Catalasas monofuncionales, con grupo hemo (en procariotas y eucariotas)
- Catalasas-peroxidasas, con grupo hemo (sólo en bacterias y hongos)
- Mn-catalasas, sin grupo hemo (en algunos procariotas anaerobios)

#### 3.5.1. Genes con dominios catalasa en el genoma de *F. fujikuroi*

La búsqueda en el proteoma de *F. fujikuroi* a través del servidor Ensemble fungi (<http://fungi.ensembl.org/index.html>, ver materiales y métodos) de enzimas con presumible actividad catalasa identificó 10 proteínas (Tabla 3.1). Algunas de ellas son fácilmente identificables como catalasas, y otras son proteínas que incluyen otros dominios. Entre ellas figuran las peroxidasas, enzimas que catalizan la oxidación de diversas moléculas donadoras de hidrógeno. Estas enzimas reducen  $H_2O_2$  mediante la donación de electrones de otras moléculas, como compuestos fenólicos, precursores de lignina, y metabolitos secundarios de auxina (Hiraga et al., 2001). En una especie muy próxima a *F. fujikuroi*, *Fusarium decemcellulare*, se ha demostrado que las catalasas protegen frente al estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$  (Medentsev et al., 2002).

En *N. crassa* se han estudiado funcionalmente tres catalasas, llamadas CAT-1, CAT-2 y CAT-3 (Chary y Natvig, 1989; Michán et al., 2003; Wang et al., 2007). La construcción de un cladograma a partir del análisis por Clustal de las secuencias proteicas de los diez genes, junto con la tres catalasas investigadas en *N. crassa* (Fig. 3.16), sugiere algunas identificaciones. El cladograma indica que Ffuj\_03451 y Ffuj\_11706 son los posibles ortólogos de CAT-1 y CAT-2, mientras que CAT-3 no tiene un ortólogo claro.



**Figura 3.16. Cladograma de los genes con dominios catalasa de *F. fujikuroi*.** Se incluyen los genes de las tres catalasas investigadas en *N. crassa* (CAT-1, CAT-2 y CAT-3).

### 3.5.2. Influencia de la luz y la mutación *carS* en la expresión de los genes con dominios catalasa de *F. fujikuroi*

Los datos de RNA-seq muestran resultados diversos para estos genes en *F. fujikuroi* (Tabla 3.1). De los 10 genes analizados, dos (nº 1 y 2 en la tabla) muestran una fuerte activación de la expresión tanto en la luz como en el mutante *carS*, perdiendo la fotoinducción en éste último. Otros genes (nº 3, 4, 5 y 6) muestran una inducción moderada en la luz, y en algunos casos, también en el mutante *carS*. Los posibles ortólogos de CAT-1 y CAT-2 se encuentran en este grupo (nº 4 y 5 en la tabla). Finalmente, tres genes (nº 7, 8 y 9) no muestran alteraciones en su patrón de expresión, y solo un gen (nº 10) muestra una leve represión por luz y por la mutación *carS*. Por tanto, en relación al efecto de la luz y la mutación *carS*, se observan patrones de expresión muy diferentes entre los genes para estas proteínas. Llama poderosamente la atención la regulación de los genes 1 y 2, por ser muy similar a la de los genes del *cluster car*.



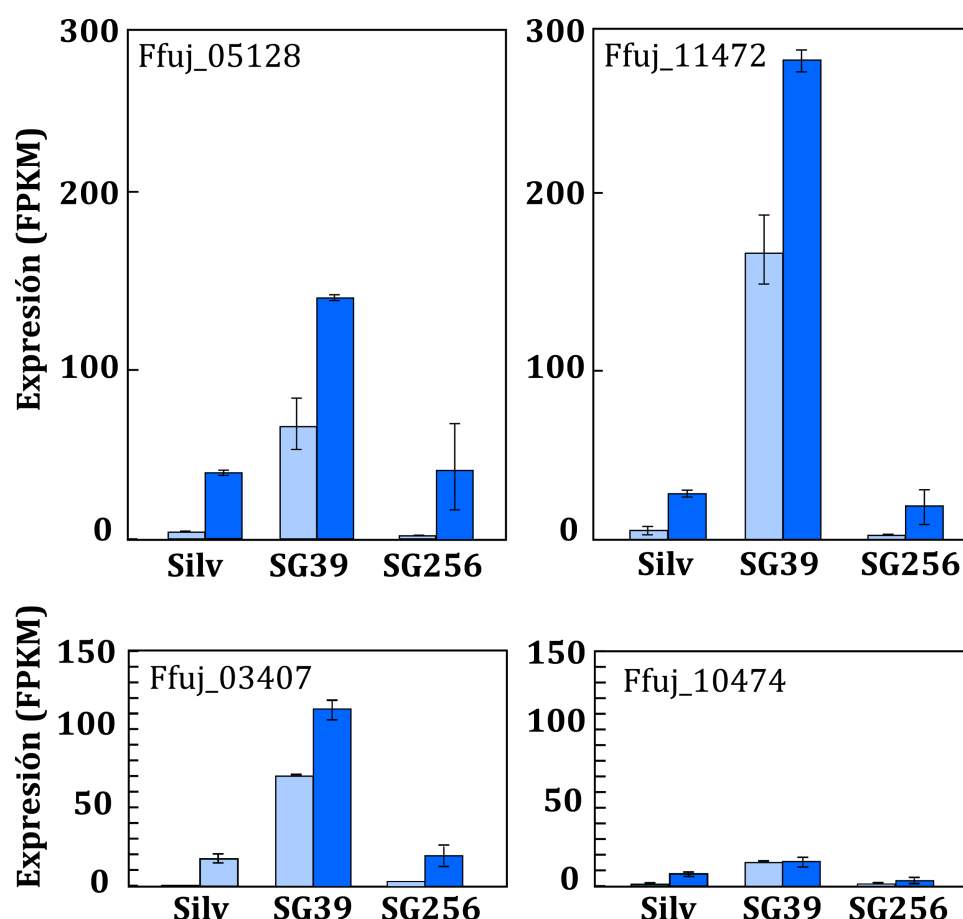
**Tabla 3.1: Efecto de la luz y la mutación del gen *carS* sobre la expresión de 10 genes con similitud con catalasas.** Los genes se han ordenado en orden decreciente por el efecto de la luz. Los niveles de ARNm se determinaron por RT-PCR. Los colores obedecen a grupos de genes citados en el texto en función de sus patrones de expresión.

Genes (Ffuj_) catalasa o con dominio catalasa *	Posible identidad	Incremento de expresión en la luz	Incremento de expresión en el mutante <i>carS</i>	Incremento de expresión en luz en el mutante <i>carS</i>
05128 (1)	CTT-1 catalasa T citosólica	79,1	133,8	2,1
11472 (2)	Catalasa isoenzima P	54,7	365,1	<2
03407 (3)	CTA-1 catalasa A peroxisomal	6,7	25,7	<2
10474 (4)	Catalasa CAT-2	4,2	8,0	<2
03451 (5)	Catalasa CAT-1	3,2	<2	<2
11706 (6)	Peroxidasa	2,1	<2	<2
02216 (7)	Catalasa isoenzima P	<2	<2	<2
06807 (8)	precursor <i>srpA</i>	<2	<2	<2
14667 (9)	Catalasa isoenzima P	<2	<2	<2
11438 (10)	Catalasa	Reprimido: 0,4	Reprimido: 0,2	2,2

\* en paréntesis, el número arbitrario de referencia para el texto

<2 significa una inducción entre 0,5 y 2

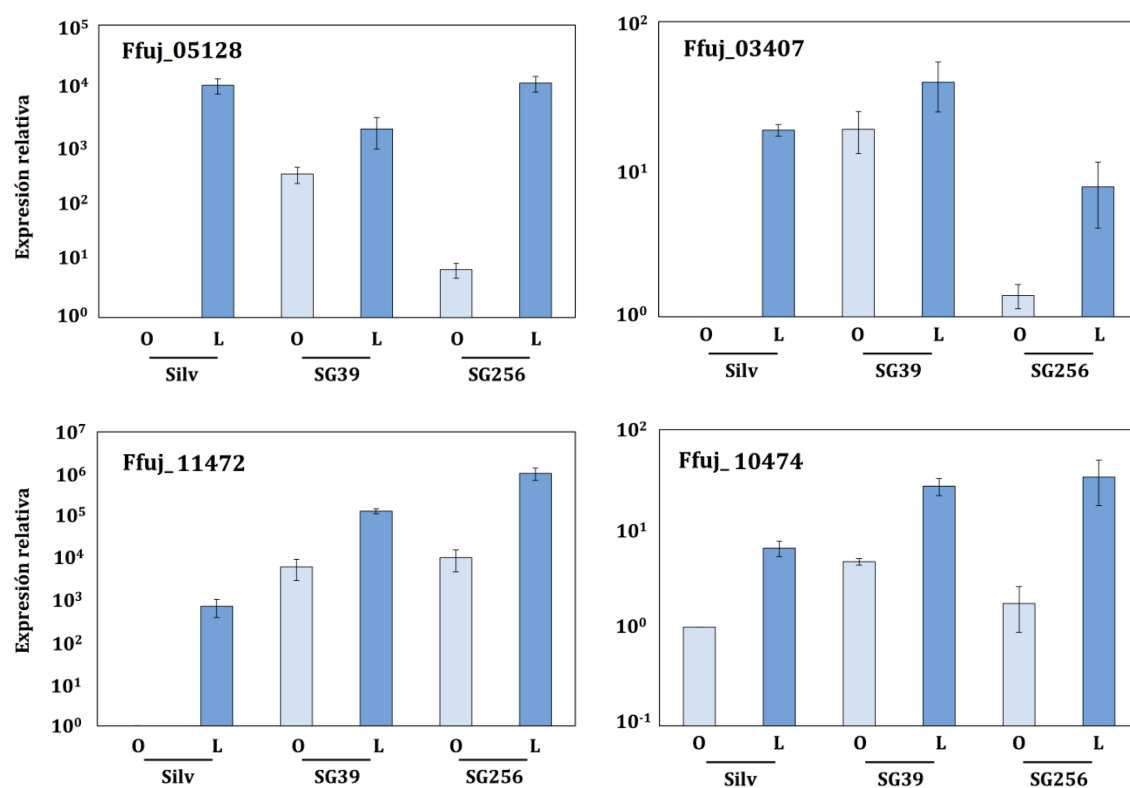
Los niveles de expresión generados por el análisis RNA-seq para los cuatro genes más influidos por la luz y la mutación *carS* se detallan en la Fig. 3.17. En estos datos se aprecia que la luz sigue aumentando los niveles de expresión en el mutante *carS*, y los niveles silvestres se recuperan en la estirpe complementante.



**Figura 3.17.** Cuantificación por RNA-seq del efecto de la mutación *carS* y la luz sobre la expresión de los genes para las cuatro proteínas de la familia de las catalasas indicadas en los gráficos. La barra de color azul claro representa la muestra en condiciones de oscuridad, la de azul más intenso la condición de iluminación.

Como confirmación de los datos de RNA-seq, se realizaron análisis de RT-PCR de la expresión de los cuatro genes descritos en la Fig. 3.17. Para ello se usaron las mismas condiciones de cultivo que en los ensayos de RNA-seq. Dado que se trata de proteínas de la misma familia, para evitar interferencias en los resultados para los distintos genes se puso especial cuidado en emplear cebadores que no correspondieran a regiones con dominios compartidos entre las distintas enzimas. Aunque ambos enfoques experimentales no son fácilmente comparables, debido a que los datos de RNA-seq proporcionan valores de expresión absolutos (haciendo posible las comparaciones entre genes distintos) mientras que los datos de RT-PCR proporcionan valores relativos (referidos a un valor control de cada gen), los resultados de expresión obtenidos (Fig. 3.18) corroboran básicamente las conclusiones derivadas de los datos de RNA-seq. Como única excepción, en el caso del

gen Ffuj\_11472, no se recuperaron los niveles silvestres de ARNm en la oscuridad en la estirpe complementante.



**Figura 3.18.** Análisis de RT-PCR del efecto de la luz y la mutación *carS* sobre la expresión de los cuatro genes descritos en la Figura 3.17. Los nombre de los genes se indican en cada recuadro.

### 3.5.3. Influencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la expresión de los genes de *F. fujikuroi* con dominios catalasa

Como información complementaria sobre la función de los diez genes para proteínas con presumible actividad catalasa investigados en el apartado anterior, se analizó el efecto del la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre su expresión, utilizando para ello las muestras ya utilizadas en la Fig. 3.15. Los resultados se resumen en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2. Incremento relativo de los niveles de ARNm de los genes indicados en la columna izquierda como resultado de la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Los genes se han ordenado en orden decreciente de activación en la estirpe silvestre. Se ha conservado el código de colores empleado en la Tabla 3.1. Los niveles de ARNm se determinaron por RT-PCR.

Genes catalasa o con dominio catalasa	Incremento de la expresión por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la estirpe silvestre	Incremento de la expresión en el mutante <i>carS</i>	Activación muy dependiente de CarS
Ffuj_05128	2,8 · 10 <sup>5</sup>	292	SI
Ffuj_14667	398	0,8	SI
Ffuj_11472	100	600	NO
Ffuj_02216	76,5	1,6	SI
Ffuj_11706	8,1	0,8	SI
Ffuj_11438	6,5	2,9	NO
Ffuj_03451	4,7	1,38	NO
Ffuj_03407	4,3	18,6	NO
Ffuj_10474	2,5	4,6	NO
Ffuj_06807	0,5	0,4	NO

La mayor parte de los genes respondieron a la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activando su expresión. La única excepción la constituye el gen Ffuj\_06807, cuyos niveles de transcritos sufrieron un ligero descenso, tanto en la estirpe silvestre como en el mutante *carS*. La activación fue muy fuerte en cuatro genes, dos de ellos con niveles de activación muy elevados también en respuesta a la luz y a la mutación *carS* (Tabla 3.1). Un resultado especialmente llamativo es que la activación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de cuatro de los genes se mostró altamente dependiente de CarS (columna derecha en la tabla).

Los cambios en el mutante *carS* respecto a la estirpe silvestre se confirmaron para todos los genes en el complementante SG256, excepto para Ffuj\_11472, que mostró una expresión mucho más elevada en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que la estirpe silvestre.

## **VI. DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

### 1. La proteína CarS

La regulación de la carotenogénesis de *F. fujikuroi* es objeto de estudio desde hace 30 años, desde los primeros trabajos sobre el desarrollo de un método eficaz de mutagénesis, que dio lugar a la identificación de sus primeros mutantes (Avalos et al., 1985), y el efecto de diferentes compuestos químicos sobre la ruta (Avalos y Cerdá-Olmedo 1986). Ya en estos primeros trabajos se puso en evidencia la existencia de mutantes de intensa pigmentación anaranjada bajo todas las condiciones de cultivo ensayadas, cuyo fenotipo externo más llamativo es la síntesis de altas cantidades de carotenoides (Avalos y Cerdá-Olmedo 1987). Estos mutantes se denominaron *carS* por la similitud de su fenotipo con los mutantes *carS* de *P. blakesleeanus* (Cerdá-Olmedo, 1987). Con independencia de su base molecular, los mutantes *carS* han sido una herramienta muy útil en distintos estudios de la carotenogénesis, especialmente como fondo genético ideal para la identificación y caracterización de mutantes en distintos pasos de la ruta (ver, por ejemplo, Prado-Cabrero et al., 2007, 2009, Díaz-Sánchez et al., 2011). También constituyeron las condiciones ideales para estudios de actividad enzimática *in vitro*, mucho más alta en el mutante *carS* que en la estirpe silvestre (Avalos et al., 1988).

Desde los primeros trabajos, se asumió que el gen *carS* codifica un represor de la carotenogénesis. De hecho, la primera hipótesis, formulada en ausencia de información molecular sobre la proteína CarS o sobre las proteínas responsables de la detección por la luz, propusieron un papel para CarS como represor directo de la expresión de los genes de la carotenogénesis. Según el modelo, la luz actuaría sobre esta represión, probablemente inactivando parcialmente la proteína CarS. La clonación de los genes estructurales en años más recientes permitieron comprobar que, efectivamente, sus niveles de ARNm son mucho mayores en los mutantes *carS*, tanto en luz como en oscuridad (Prado et al., 2004; Prado Cabrero et al., 2007). Estas características desligan totalmente la naturaleza del fenotipo *carS* en *F. fujikuroi* del de *P. blakesleeanus*, donde la mutación *carS* apenas cambia la expresión de los genes estructurales de la carotenogénesis (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008) y donde CarS no

es una proteína reguladora, sino una enzima dioxigenasa que produce un corte oxidativo en el  $\beta$ -caroteno (Tagua et al., 2012).

La reciente identificación del gen *carS* y la pertenencia de la proteína codificada a la familia RING finger, ha abierto nuevas perspectivas en el estudio de la base molecular de la sobreproducción de carotenoides en sus mutantes, permitiendo el diseño de estrategias experimentales que aporten más información sobre sus presuntos mecanismos de acción, uno de los objetivos principales de este trabajo. Además, su parecido con la proteína CrgA de *M. circinelloides*, cuya mutación produce un fenotipo similar en este hongo, aporta pistas de indudable relevancia, más aún si se tiene en cuenta el grado de profundidad que se ha alcanzado en el estudio de las funciones de CrgA en dicho organismo (ver, por ej., Lorca-Pascual et al., 2004; Murcia-Flores et al., 2007; Silva et al., 2008). El parecido entre ambas proteínas es mayor del esperado, a juzgar por la presencia de otro dominio RING finger en CarS, descubierto en esta Tesis, no detectado anteriormente debido a un error de anotación del gen en el genoma. Sin embargo, sus diferencias de secuencia, así como de ubicación y conformación de sus respectivos dominios, unido a la gran lejanía taxonómica entre ambos hongos, obligan a considerar con mucha precaución las posibles similitudes de sus mecanismos de acción.

Es pertinente recordar, no obstante, la llamativa similitud de los fenotipos de los mutantes *carS* de *F. fujikuroi* y *crgA* de *M. circinelloides*. El parecido se extiende también a sus patrones de expresión, ya que en ambos casos la luz produce un aumento en las cantidades de sus ARNm (Navarro et al., 2001; Rodríguez-Ortiz et al., 2012; Rodríguez-Ortiz et al., 2013), como ocurre también con la del gen ortólogo en el cigomiceto *B. trispora* (Quiles-Rosillo et al., 2005). Dicha inducción se ha confirmado en los resultados descritos en esta Tesis. Además, tanto los fenotipos mutantes *carS* como *crgA* son pleiotrópicos, y no se limitan a la desregulación de la carotenogénesis. Así, los mutantes *carS* están afectados también en la producción de otros metabolitos, como las giberelinas o las bikaverinas (Candau et al., 1991; Rodríguez-Ortiz et al., 2010). En el caso de CrgA, además de la síntesis de carotenoides, la proteína participa en el control del desarrollo de hifas aéreas y en la producción de esporas asexuales (Nicolás et al., 2007), acciones que lleva a cabo mediante el control de la actividad de la proteína White Collar Mcwc-1b (Silva et al., 2008; Navarro et al., 2013). La forma activa, no ubiquitinada, de Mcwc-1b es capaz de activar la expresión de los genes de la



carotenogénesis y reprimir los genes implicados en la producción de las esporas sexuales. Sin embargo, la ubiquitilación de Mcwc-1b, mediada por CrgA, impide que pueda llevar a cabo ambas funciones.

Aunque no hay precedentes de que los dominios RING finger permitan la unión a ADN (Matthews y Sunde, 2002; Gamsjaeger et al., 2007), se estimó necesario comprobar experimentalmente la posibilidad de que CarS ejerza su acción directamente sobre los promotores de los genes de la carotenogénesis. La expresión de la proteína CarS en *E. coli* ha permitido su purificación y su utilización en estudios de retardo de bandas (EMSA), para lo cual se utilizó una región promotora bidireccional del *cluster car* para la que ya se había mostrado la existencia de retraso de bandas a partir de un extracto crudo de la estirpe silvestre, ausente cuando el extracto se obtenía de un mutante *carS* (Rodríguez-Ortiz, 2012). El resultado negativo de estos ensayos, congruente con el conocimiento previo sobre estos dominios proteicos, hace muy improbable la hipótesis de la unión al ADN, pero no la descarta definitivamente. La purificación de la proteína permitió también la comprobación de la eficiencia de un anticuerpo frente a un epítipo de CarS, predicho informáticamente, que respaldó su uso en ensayos posteriores de *western*. El empleo de dicho anticuerpo en ensayos de fraccionamiento y localización subcelular indicaron que CarS no se ubica en el núcleo, al menos bajo las condiciones estudiadas, por lo que muy probablemente ejerce su función reguladora en el citoplasma.

## 2. Posibles dianas regulatorias de CarS

Dado que CarS no parece actuar directamente sobre los genes de la carotenogénesis, la información disponible permite anticipar que ejerce su acción interactuando con otra(s) proteína(s) reguladoras, entre las que pueden figurar factores de transcripción que se unan directamente a los promotores de los genes objeto de regulación. En el caso de CrgA, se ha demostrado que sus dominios RING finger son esenciales para su función (Lorca-Pascual et al., 2004; Murcia-Flores et al., 2007) y que la proteína posee actividad ligasa de ubiquitina, de forma que transfiere a Mcwc-1b la ubiquitina conjugada en una proteína E2. Puesto que *F. fujikuroi* posee una sola proteína White Collar, y dado que ésta es necesaria para la activación por la luz de los genes de la carotenogénesis en este hongo (Castrillo y Avalos, 2015), la posible modulación de la actividad de WcoA por CarS es una hipótesis muy tentadora.

En esta Tesis no ha sido posible demostrar en ensayos de doble híbrido la existencia de tal interacción, ni la posible interacción de CarS consigo mismo. Tampoco apareció WcoA en el escrutinio de interacción con CarS mediante una genoteca de ADNc, a pesar de que algunos de los candidatos salieron varias veces, lo que supone síntomas de saturación en la búsqueda. No podemos descartar que tal interacción requiera la participación de al menos una tercera proteína, como puede ser la proteína ortóloga a WC-2, WcoB, presente también como una sola copia en el genoma de *F. fujikuroi*. Esta proteína no ha sido aún objeto de estudio en este hongo, pero por paralelismo con su funcionamiento en otros hongos, es muy probable que forme un heterodímero con WcoA. Otra posibilidad es que WcoA deba sufrir algún tipo de modificación post-traducciona para poder interactuar con CarS, como puede ser la fosforilación. Ese es el caso de WC-1 en *N. crassa*, que es objeto de fosforilaciones en el proceso de atenuación que sucede a la iluminación (Corrochano, 2007).

Como ya se ha indicado, el escrutinio global de proteínas capaces de interactuar con CarS ha proporcionado varios positivos, como cabría esperar de la participación de CarS en otros procesos celulares. Así, los resultados muestran que CarS es capaz de interactuar con una proteína homóloga a Cwh43p de *S. cerevisiae*. El gen *CWH43* se clonó a partir de mutantes de esta levadura hipersensibles a calcofluor white y se corresponde con *YCR017C* (Ram et al., 1994; Martin-Yken, 2001). Su mutación provoca defectos en el crecimiento y la liberación de componentes de la pared, como el  $\beta$ -glucano o proteínas glicosiladas. Estos defectos son similares a los de los mutantes de la ruta de la integridad de pared celular mediada por PKC1 (Martin-Yken, 2001). Cwh43p tiene dominios transmembranales e inicialmente se localizó en las puntas de las gemas de *S. cerevisiae*; sin embargo, mediante fusión a la proteína roja fluorescente (RFP), se ha localizado posteriormente en la membrana del retículo endoplasmático (Umemura et al., 2007). En hongos filamentosos no se ha estudiado su localización, pero la presencia de dominios transmembranales en ChwA apoyan la idea de una misma localización en el retículo endoplasmático.

*CWH43* es homólogo al gen *PGAP2* de mamíferos. La proteína es necesaria para la reacilación del glicosilfosfatidilinositol (GPI), que llevan como anclaje las proteínas de la membrana (Ghugtyal et al., 2007). Se ha demostrado en *S. cerevisiae* que esta proteína convierte la parte lipídica del anclaje del GPI en ceramida (Umemura et al., 2007). Esto es consistente con la presencia de un dominio lipocalina, que forma parte

de la estructura en la proteína homóloga en *F. fujikuroi*, que hemos denominado CwhA. Este dato conlleva una implicación especialmente interesante. Las lipocalinas constituyen una superfamilia de proteínas de bajo peso molecular, unos 20 kDa, que puede ser mayor en función del patrón de glicosilación (Unterman et al. 1981). Desde su descubrimiento, hace unos 35 años, se han caracterizado más de 40 lipocalinas, presentes desde bacterias y levaduras a plantas y animales. La mayoría son proteínas extracelulares que transportan moléculas hidrofóbicas de pequeño tamaño. En eucariotas son dirigidas al medio externo gracias a la presencia de un péptido señal localizado en el extremo amino-terminal, que es eliminado cuando la proteína llega al retículo endoplásmico para su exportación. Sus funciones pueden ser muy diversas. Entre las lipocalinas no secretadas cabe destacar la proteína Lazarillo, que se encuentra anclada a la membrana plasmática de las neuronas a través de GPI (Ganforina y Sánchez, 1995).

Las lipocalinas poseen la capacidad unirse a distintas sustancias (Salier et al. 2004), tales como moléculas hidrofóbicas pequeñas y receptores celulares de superficie, además de poseer la capacidad de formar complejos con otras macromoléculas solubles. El motivo del especial interés del dominio lipocalina es que un subtipo de estas proteínas es capaz de unirse a retinol (Di Masi et al. 2016). En *F. fujikuroi*, el *cluster* de genes *car*, regulado por CarS, incluye a los genes necesarios para sintetizar retinal, junto con la opsina CarO, presunta destinataria del retinal como cromóforo. Una importante laguna de información, común a las rutas de síntesis de carotenoides en hongos, es la escasa información disponible sobre los lugares físicos donde se lleva a cabo la síntesis de carotenoides en estos organismos, o sobre el destino o la función del carotenoides sintetizado. En *F. fujikuroi* se desconoce además si la síntesis de retinal y las de neurosporaxantina están funcionalmente relacionadas. Así, es posible que la neurosporaxantina se acumule en membranas, pero tampoco se puede descartar que se una al menos en parte a una proteína receptora, que podría ser de la familia de las lipocalinas.

Una hipótesis aún más sugerente, teniendo en cuenta que el *cluster* de genes *car* es un objeto preferente de regulación por CarS en comparación con los genes específicos de síntesis de neurosporaxantina, es que el homólogo de *CWH43* cumpla la función de detectar la presencia de retinal libre en la célula con fines regulatorios. Es plausible que la regulación mediada por CarS tenga como objetivo asegurar la

disponibilidad de retinal para las rodopsinas del hongo. En ese contexto, tiene sentido que la regulación de CarS se centre en el control del *cluster car*, que no solo contiene los genes necesarios para la síntesis de retinal, sino también una proteína receptora del retinal, la rodopsina CarO. El gen para esta rodopsina es, de hecho, uno de los genes más activados por la luz y por la ausencia del gen *carS* en el transcriptoma.

No es descabellado por tanto especular sobre la existencia de una red de regulación en la que intervengan CwhA y CarS. A este respecto, otro dato de interés de CwhA es que la región de la proteína detectada como responsable de la interacción con CarS corresponde a la zona que se sitúa en la región citoplasmática, mientras que el dominio lipocalina se encuentra en la membrana. Es posible por tanto que CwhA sea capaz de ligar retinal u otro carotenoide en la membrana, y que CarS interaccione con esta proteína de forma diferencial por su cara citoplásmica en función de que CwhA esté unido o no a la señal. La interacción con CarS podría desencadenar un cambio, posiblemente la activación o la inactivación de la propia proteína CarS, que modifique su disponibilidad para actuar positiva o negativamente sobre otras proteínas diana, dando lugar a una respuesta regulatoria en la síntesis de carotenoides. Como primer paso en la comprobación de esta hipótesis, se deberá llevar a cabo la caracterización funcional de *cwhA*, y en particular el estudio del efecto de su mutación.

El escrutinio de proteínas capaces de interaccionar con CarS ha proporcionado un número de candidatos muy limitado. La interacción, especialmente fuerte con CwhA, fue aparentemente más débil en los otros casos identificados. Con independencia del grado de fuerza de la interacción, la reiteración de los clones sugiere que son interacciones reales, aunque cabe la posibilidad de que no tengan relevancia *in vivo*. Por otro lado, la repetición de varios de los clones en el escrutinio sugiere un número escaso de dianas, y por tanto una alta especificidad de CarS en sus interacciones con otras proteínas en la célula. Entre las otras proteínas identificadas figura una posible  $\beta$ -glucosidasa, una clase de enzimas muy extendidas en plantas, hongos y bacterias con un elevado grado de conservación en sus secuencias y estructuras. En función de la especificidad del sustrato se clasifican en (1) aril- $\beta$ -D-glucosidasas (con fuerte afinidad por los aril- $\beta$ -D-glucosidos), (2) celobiasas (hidrolizan solo disacáridos) y (3) glucosidasas de amplio espectro (la familia más frecuente, activas sobre gran diversidad de sustratos) (Singh et al., 2015). Las

proteínas de tipo CwhA son habitualmente glicosiladas, por lo que es de nuevo sugerente que la  $\beta$ -glucosidasa y CwhA puedan estar funcionalmente relacionadas. Por ejemplo, la  $\beta$ -glucosidasa podría modular la actividad de CwhA por deglicosilación, lo cual podría llevar a cabo por reclutamiento por su interacción con CarS. Lógicamente, no se pueden descartar otras funciones posibles para esta  $\beta$ -glucosidasa, por ejemplo relacionadas con el mantenimiento de la estructura de la pared celular.

La identificación de una aminoacil ARNt sintetasa entre las dianas de interacción también sugiere la participación de CarS en la modulación de aspectos más básicos del metabolismo. En este caso puede estar relacionado con la disponibilidad de ARNt cargados con el aminoácido arginina, lo cual puede emplearse como indicación de escasez de aminoácidos que podría desencadenar una serie de señales comunes a la falta de nitrógeno. Podría ser por tanto una proteína utilizada por CarS para sensar la disponibilidad de nitrógeno en la célula. En definitiva, la información proporcionada por el escrutinio de interacciones de CarS abre un campo de posibilidades cuyas comprobaciones requerirán un considerable esfuerzo en futuras investigaciones.

### **3. Impacto de la ausencia de CarS en el transcriptoma y relación con la luz**

La tecnología RNA-Seq permite cuantificar los niveles de ARNm de todos los genes anotados en el genoma de un organismo, en un tejido concreto o en una condición de cultivo específica. Esta técnica, considerada como la más avanzada actualmente en estudios de expresión génica, se utiliza para fines muy distintos en cualquier tipo de organismo (Hoen et al., 2008; Wang et al., 2009; Chen et al., 2011; Oszlak y Milos, 2011; McClure et al., 2013; Van Verk et al., 2013). La tecnología RNA-seq presenta diversas ventajas sobre el uso de microarrays: (Zhao et al., 2014). En primer lugar, no requiere sondas específicas, siendo suficiente con el aislamiento de muestras de ARN total. Segundo, es mucho más versátil, ya que permite detectar nuevos transcritos, fusiones de genes, variantes génicas (inserciones, deleciones), así como variaciones en la eliminación de intrones, los cuales no son detectados por los microarrays. Además, confirma la identificación de genes en procesos previos de anotación y permite la detección de ARNs no codificantes u otros genes novedosos. Por último, posee un amplio rango dinámico: mientras que en los microarrays se

produce saturación de la señal, la tecnología RNA-seq permite una cuantificación dentro de márgenes mucho más amplios. De hecho, es el método más sensible para la detección de genes con expresión muy baja, permitiendo la detección de transcritos raros y genes expresados débilmente. Es además más preciso en la estima de la expresión de genes muy abundantes

Dada la estrecha relación entre la carotenogénesis y la regulación por luz, y el papel central de la proteína CarS en la regulación de esta ruta, se decidió utilizar la tecnología RNA-seq para realizar un estudio global sobre el efecto de la luz y de la mutación *carS* en el transcriptoma de *F. fujikuroi*. Debido a la dificultad de obtener mutantes dirigidos del gen *carS* en este hongo (Rodríguez-Ortiz, 2012), se sacó provecho de la disponibilidad de una estirpe complementante de un mutante *carS* obtenido por mutagénesis (SG39), para así descartar los efectos causados por mutaciones secundarias.

El análisis transcriptómico mostró un impacto global de la luz menor al observado en *N. crassa* (Wu et al., 2014), una especie que representa actualmente una referencia obligada en estudios de fotobiología de hongos. En *N. crassa*, donde se miraron varios tiempos de iluminación, el número de genes cuya expresión se ve influida por la luz alcanza el 30%. En el caso de *F. fujikuroi*, de los aproximadamente 15.000 genes expresados en su genoma en las condiciones estudiadas, alrededor de un 8% cambia su expresión al menos dos veces, por debajo o por encima, por efecto de la luz. El impacto de la mutación del gen *carS* en el genoma no es muy diferente, con aproximadamente un 10% de los genes directa o indirectamente afectados. No es posible hacer comparaciones con *N. crassa* en relación a al efecto de la mutación *carS*, porque tales tipos de mutantes no se han descrito en este hongo.

En el efecto de la luz predomina la activación mientras que en el caso de la proteína CarS predomina la represión, si bien en ambos casos se dan también efectos regulatorios opuestos. De hecho, existe una correlación entre genes activados por luz y genes reprimidos por CarS, puestos en evidencia por su activación en el mutante *carS*. Dicha correlación es mostrada por los solapamientos entre ambas poblaciones de genes, mucho mayores que lo esperado por azar, lo que indica conexiones regulatorias entre la luz y la proteína CarS. Esta conclusión se manifiesta también cuando observamos que el número de genes que se ven influidos por la luz baja drásticamente en el mutante *carS*.

En un escrutinio previo de genes regulados por la proteína CarS, basado en un método de hibridación sustractiva, el impacto estimado sobre el transcriptoma fue menor, ya que solo se identificaron unos 60 genes (Rodríguez-Ortiz et al., 2013). Esta cantidad, que incluye tanto los genes activados como los reprimidos en el fondo *carS*, representa un porcentaje inferior al 0,5% de los genes del hongo y corresponde globalmente a una eficacia experimental al menos un orden de magnitud inferior a la obtenida con el método de RNA-seq. Esta diferencia se debe probablemente a que el análisis por hibridación sustractiva está sesgado a aquellos genes con expresión más elevada. Además, la técnica de RNA-seq analiza todos los genes simultáneamente, de forma global, mientras que la hibridación sustractiva es un método selectivo, y que en nuestro caso no alcanzó la saturación, como muestra la ausencia de alguno de los genes *car* entre los genes identificados.

Algunos de los genes identificados previamente en el estudio de hibridación sustractiva han sido confirmados en el análisis de RNA-seq. Entre ellos figuran un homólogo del gen *rds1*, implicado en estrés y que posee un dominio de unión a ARN, y el homólogo de *bli-4* de *N. crassa*, que codifica para una supuesta deshidrogenasa de retinol (retinol DH) dependiente de luz. Las deshidrogenasas de retinol (RDH) participan en el metabolismo de los esteroides, las prostaglandinas y los retinoides, realizando reacciones de oxido-reducción en el ciclo de los retinoides. Entre las RDHs de mamíferos se ha estudiado RDH13 de ratón, que se localiza en la parte externa de la membrana interna de la mitocondria del epitelio pigmentado de la retina. Se asume que serviría de barrera y protegería frente al daño oxidativo causado por la luz (Wang et al 2012). En humanos, la RDH13 se localiza también en la mitocondria y podría estar implicada en la protección frente al estrés oxidativo causado por el retinaldehído. Por otro lado, hay evidencias de que RDH13 protege específicamente frente a la apoptosis inducida por la luz en los fotorreceptores y por tanto inhibiría la muerte celular asociada a las mitocondrias.

Tanto el estudio previo por hibridación sustractiva como el análisis de RNA-seq descrito en esta tesis coinciden en los genes del *cluster car* como uno de los objetos principales de regulación de la proteína CarS. Efectivamente, los genes del *cluster car* figuran entre aquellos que se ven más influidos tanto por la luz como por la mutación del gen *carS*, reforzando el papel central de la proteína CarS en su control. Fuera de los genes del *cluster*, la regulación por CarS se centra sobre todo en el gen *carT*, ubicado

en otro entorno del genoma, ejerciendo una influencia más débil sobre el gen *carD*, aunque ambos sean necesarios para la síntesis de neurosporaxantina. Por su parte, *carD* tampoco se ve apenas afectado por la luz. Otros genes fuertemente regulados por luz incluyen a los de los fotorreceptores CryD y VvdA, cuya fotoinducción era ya conocida por investigaciones previas del grupo (Castrillo et al., 2013; Castrillo y Avalos, 2014) y que desempeñan también un papel en la regulación de la carotenogénesis. Sin embargo, estos genes están mucho menos sujetos a regulación por CarS que por luz, sirviendo de ejemplos claros de la separación de ambos mecanismos de regulación. Como ya se ha indicado, se especula sobre un posible papel de CarS en la regulación de WcoA, posiblemente relacionada con la regulación por ubiquitinación descrita para CrgA y Mcw-1 en *M. circinelloides* (Silva et al., 2008). Los datos de RNA-seq muestran la inexistencia de regulación de la transcripción de *wcoA* por la luz o por la proteína CarS, lo cual no es incompatible con una regulación post-transcripcional mediada por CarS. En este momento, WcoA es la única proteína candidata a mediar la fotoinducción de la transcripción de los genes del cluster *car*, y de hecho su pérdida por mutación no solo produce la pérdida de fotoinducción del cluster, sino que reduce su nivel de expresión en la oscuridad, apuntando a WcoA como su activador transcripcional principal (Castrillo y Avalos, 2015).

En una Tesis anterior del grupo (Rodríguez-Ortiz, 2012) se especuló sobre la posible implicación de microARNs en la regulación por CarS. El genoma de *F. fujikuroi* contiene todos los genes implicados en el mecanismo canónico de silenciamiento por ARN, como los de las proteínas Dicer, Ago y RdRP, y en el grupo se está realizando la delección dirigida de los genes *dicer1* y *dicer2*. Datos recientes de RNA-seq para ARNs pequeños (datos no publicados) han descartado la posible participación de microARNs en la regulación de la carotenogénesis, pero el análisis de RNA-seq está destapando transcritos no codificantes, que pudieran desempeñar funciones regulatorias. Unos de ellos en concreto, próximo al gen *carS*, está siendo actualmente objeto de estudio en el grupo por su posible implicación en la regulación en el control de cluster *car*. De confirmarse, añadiría un nuevo nivel de complejidad en los mecanismos moleculares en los que la proteína CarS está implicado.



#### 4. Relación de CarS con las condiciones de estrés

El análisis de las alteraciones en el transcriptoma resultantes de la ausencia de CarS revela cambios en diferentes categorías de genes relacionados con diversos aspectos del metabolismo. Un grupo minoritario de genes afectados se asocian a funciones de estrés. Aunque no destacaron por su número, algunos de ellos si lo hacen por la magnitud de los cambios observados. Entre ellos figuran genes implicados en la defensa frente a estrés oxidativo, y en particular varios genes de catalasas. Tanto los datos de RNA-seq como la posterior verificación mediante RT-PCR revela que la luz ejerce un potente incremento en la expresión de muchos de estos genes. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce daño en el ADN, parada del ciclo celular y cambios drásticos en la morfología de la mitocondria (Jaimes-Arroyo et al., 2015). Esto podría explicar por qué algunos de los genes que se inducen en mayor grado por luz o por la mutación *carS*, están implicados en la prevención del estrés en la mitocondria.

Considerando las supuestas propiedades antioxidantes de los carotenoides, la coincidencia en la regulación de la expresión de los genes de la carotenogénesis con algunos genes relacionados con estrés oxidativo no deja de ser un dato sugerente. Los carotenoides, especialmente las xantofilas, han sido descritas como agentes antioxidantes en hongos (Avalos y Limón, 2015). Un ejemplo claro lo tenemos en *S. cerevisiae*. Sus estirpes silvestres carecen de genes de síntesis de carotenoides, pero la expresión heteróloga de genes de síntesis de xantofilas en esta levadura produce un aumento sensible en la resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ukibe et al., 2009). Distintos datos indirectos sugieren que la neurosporaxantina posee también actividad antioxidante. En *N. crassa*, la síntesis de esta xantofila en respuesta a la luz es mayor en ausencia de actividad superóxido dismutasa (Yoshida y Hasunuma, 2004). En *Fusarium aquaeductuum*, la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de cultivo estimula la síntesis de neurosporaxantina en la oscuridad (Bindl et al., 1970). Como se discutirá a continuación, datos mostrados en esta Tesis indican una activación de la carotenogénesis en respuesta a distintos tipos de estrés, incluyendo la presencia de una concentración subtóxica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De hecho, la regulación por luz puede interpretarse también como una respuesta a estrés, ya que la luz aumenta el estrés oxidativo.

Las tres condiciones de estrés investigadas en el capítulo 3, escasez de nitrógeno, choque térmico y estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno, aumentan tanto la síntesis de carotenoides en la oscuridad como la expresión de los genes estructurales *carRA* y *carB*. En el caso del estrés oxidativo, los niveles de carotenoides son incluso más elevados que los producidos por la luz. En el trabajo ya citado de *F. aquaeductuum* (Bindl et al., 1970), los autores publicaron la cinética de acumulación de carotenoides en respuesta a la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siendo esta similar en las primeras 24 horas a la cinética de acumulación en respuesta a la luz. Aunque los mecanismos de detección pueden ser distintos, parece probable que la transmisión de la señal desde la luz y desde el estrés oxidativo hasta los genes objeto de regulación tengan a la proteína CarS como un elemento compartido en la cadena de respuesta. También se encuentra en ese caso el estrés térmico, cuya respuestas transcripcionales a nivel de los genes *carRA*, *carB* y *carS* son similares a las del estrés oxidativo. De hecho, ambos factores de estrés coinciden en la generación de daños a nivel de proteínas, pudiendo desempeñar la proteína HSF, altamente conservada en hongos y otros organismos (Pirkkala et al., 2001; Richter et al., 2010), un papel central como desencadenante de este proceso.

Un dato particularmente interesante de los experimentos de estrés térmico y oxidativo es la correlación negativa en la oscuridad entre los niveles de ARNm del gen *carS* y los de los genes *carRA* y *carB*. Al ser la proteína CarS un regulador negativo de la carotenogénesis, los resultados sugieren una conexión causa-efecto. También podría desempeñar un papel que la proteína CarS fuera particularmente sensible al estrés, ya que bajarían así los niveles de proteína activa y redundaría en una menor represión de la carotenogénesis. De hecho, la síntesis de carotenoides en la oscuridad es al menos un orden de magnitud mayor en la estirpe silvestre a 30°C que a 22°C (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987), lo que podría ser debido a una mayor estabilidad de CarS a 22°C. La respuesta celular al choque térmico origina la inducción de una serie de proteínas llamadas HSP (*heat shock protein*) (Killen et al., 1988, Gao et al. 2004, Guisbert, et al., 2004), capaces de interaccionar con proteínas mal plegadas o desnaturalizadas, entre las que podría figurar CarS.

Por el contrario, el escenario es muy diferente en el casos de la activación por la luz y por la escasez de nitrógeno. En ambas situaciones aumentan tanto los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB* como los del propio gen *carS* en relación a sus

niveles en oscuridad o en exceso de nitrógeno. Por tanto, el aumento de expresión de los genes *carRA* y *carB* no se puede atribuir a un descenso en la expresión de *carS*. Este hecho parece indicar que la activación de la carotenogénesis por estrés térmico u oxidativo se produce a través de un mecanismo molecular diferente al causante de la activación por luz o por escasez de nitrógeno. En el primer caso puede estar asociado a la menor cantidad esperada de proteína CarS, un dato que será necesario comprobar en futuros experimentos de *western*. En el segundo caso puede ser causado por la inactivación de la proteína CarS, aunque ésta se encuentre posiblemente incluso en mayor cantidad, a juzgar por el aumento en los niveles de ARNm del gen. En el caso de la regulación por nitrógeno, es especialmente sugerente que pueda desempeñar algún papel su posible interacción con la arginil ARNt sintetasa cuando ésta no encuentra arginina para desempeñar su función habitual en la célula.

Otro dato especialmente interesante de la función de la proteína *carS* es su aparente versatilidad funcional. La mutación del gen *carS* no sólo da lugar a la activación de numerosos genes, sino que produce la represión de otros muchos, aunque el primer efecto sea cuantitativamente más importante. La asociación preferente de la mutación *carS* con cambios en la regulación de genes implicados en diferentes aspectos del metabolismo puede tener que ver con su participación en la regulación por escasez de nitrógeno, proceso en el que parece desempeñar un papel relevante. Así lo indica, por ejemplo, los efectos de la mutación en el gen *carS* en la regulación de las síntesis de giberelinas y bikaverinas (Rodríguez-Ortiz et al., 2012), dos rutas biosintéticas activadas por la desaparición del nitrógeno del medio (Candau et al., 1992; Giordano et al., 1999). La multiplicidad de funciones de la proteína CarS es reforzada también por su participación en la inducción por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de al menos cuatro genes de posibles catalasas. No todos los genes con dominios catalasas inducidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se espera que actúen en su detoxificación, ya que las especies reactivas de oxígeno (ROS) no solo son una forma de estrés sino que se utilizan también como señales reguladoras del crecimiento y la diferenciación de los organismos gracias a su generación por NADPH oxidasas, también llamadas enzimas NOX (Jaimes-Arroyo et al., 2015). En hongos como *A. nidulans* o *N. crassa* son esenciales para el crecimiento polar. Las enzimas NOX también intervienen en la señalización de otras especies de hongos, animales y plantas.

Por su elevada concentración de carotenoides, los mutantes *carS* se han utilizado anteriormente para estudiar el posible papel de estos pigmentos en el estrés oxidativo. Así, datos previos han sugerido mayor resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de mutantes *carS* que de la estirpe silvestre (Macías-Seino, 2010), aunque estos experimentos se realizaron en un fondo genético distinto (FKMC1995). En esta Tesis hay indicios de una mayor resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de los mutantes *carS* a nivel de germinación de las esporas, pero no así a nivel de desarrollo de las colonias, observándose más bien el efecto contrario. La participación del propio gen *carS* en la regulación de algunas presuntas catalasas complica mucho la interpretación de estos resultados, ya que la mutación *carS* altera a la vez tanto la concentración de carotenoides como la expresión de los genes de las catalasas.

La identificación de CwhA como posible diana regulatoria de CarS puede contemplarse también como una relación potencial con mecanismos de estrés, en particular por su vinculación un posible papel en el mantenimiento de la integridad celular. La ruta de integridad de la pared celular de *S. cerevisiae* está regulada a distintos niveles, desde el propio ciclo celular, hasta en respuesta a estímulos externos causantes de estrés sobre la pared, como altas temperaturas, hipo-osmolaridad (Davenport et al., 1995), estrés oxidativo (Vilella et al., 2005), mutaciones en componentes de la pared celular (de Nobel et al., 2000), compuestos que causan daños sobre la pared (García et al., 2004) o pH alcalino (Serrano et al., 2006). La composición y organización de la pared celular varía en diversas situaciones fisiológicas, como el crecimiento o la necesidad de adaptarse a un medio externo cambiante, incluyendo condiciones que puedan comprometer su integridad.

## **VII. CONCLUSIONES**



## VII. CONCLUSIONES

1. Se ha revisado la estructura predicha para la proteína CarS, cuyo gen figuraba erróneamente anotado en el genoma de *Fusarium fujikuroi*. El gen *carS* posee un solo intrón y la proteína contiene dos dominios RF en la región del extremo carboxilo. Estas características la aproximan más a nivel estructural a la proteína CrgA de *Mucor circinelloides*.
2. La detección de CarS con un anticuerpo específico en experimentos de fraccionamiento celular indica que es una proteína citoplásmica y los ensayos de unión a un promotor de la carotenogénesis sugieren que su función no es llevada a cabo mediante su unión a los promotores de los genes *car*.
3. De forma similar al gen *crgA* de *Mucor circinelloides*, el gen *carS* es regulado moderadamente por la luz. El aumento en los transcritos es reflejado por un aumento sensible de proteína CarS en el cultivo en iluminación, detectable en experimentos de *western*.
4. Se han identificado tres proteínas candidatas a interaccionar específicamente con CarS. La interacción más clara se ha detectado con una proteína de membrana con un dominio lipocalina cuyo ortólogo en *S. cerevisiae* está implicada en el desarrollo e integridad de la pared celular. Por sus funciones en algunas proteínas de esta familia, el dominio lipocalina podría ligar un apocarotenoide, lo que refuerza la posible relación con la proteína CarS.
5. El efecto de la luz sobre el transcriptoma de *F. fujikuroi* es mayormente activador. El número de genes afectados es mayor en la estirpe silvestre que en un mutante *carS* (4,78 % frente a 1,14 % del total de genes detectados), indicando que la regulación por la luz se pierde en el mutante *carS* para numerosos genes.
6. El efecto de la mutación del gen *carS* sobre el transcriptoma de *F. fujikuroi* es predominantemente activador. La proteína CarS influye sobre la expresión de numerosos genes relacionados con diferentes procesos metabólicos, ocupando un lugar destacado por el nivel de desregulación en el mutante *carS* los genes del *cluster* de la carotenogénesis y algunos genes relacionados con respuestas a estrés..

7. Aproximadamente un 27 % de los genes activados al menos dos veces por la luz o por la mutación en el gen *carS* son coincidentes, subiendo este porcentaje a 40% si el umbral de activación es de ocho veces. La alta correlación entre ambos juegos de genes indica conexiones regulatorias entre el control de la expresión génica por la luz y por la proteína CarS.
8. Entre los genes cuya expresión es activada más fuertemente por la luz y la mutación *carS* figuran varios genes asociados a respuesta a estrés, entre los que destacan varios genes con dominios catalasa, lo que es consistente con un papel de la proteína CarS en el control del estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno.
9. Tanto el contenido de carotenoides como los niveles de ARN mensajero de los genes *carRA* y *carB*, necesarios para su síntesis, aumentan en respuesta distintas condiciones de estrés además de la luz, como la escasez de nitrógeno, el choque térmico o la presencia de peróxido de hidrógeno.
10. En respuesta al estrés térmico y oxidativo por peróxido de hidrógeno, los niveles de ARN mensajero del gen *carS* cambian de forma opuesta a los de los genes estructurales *carRA* y *carB* en oscuridad, pero no en respuesta a la luz o a la escasez de nitrógeno, lo que indica al menos dos mecanismos de acción distintos de CarS frente a dichas condiciones ambientales.
11. Casi todos los genes de la familia de las catalasas responden a la presencia de peróxido de hidrógeno aumentando su expresión. Al menos en cuatro de los genes ensayados, dicha activación es dependiente de la proteína CarS.



## **VIII. MATERIALES Y MÉTODOS**



## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Estirpes

Las estirpes empleadas en esta Tesis se describen en las tablas M.1, M.2 y M.3.

**Tabla M.1. Estirpes de *Fusarium fujikuroi***

Estirpe	Genotipo	procedencia	Origen o Referencia
IMI58289	silvestre		Imperial Mycological Institute (Kew, Surrey, Inglaterra)
SG1	Mutante <i>carS</i> obtenido por NG	IMI58289	Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987
SG22	mutante <i>carS</i> obtenido por NG	IMI58289	Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987
SG36	mutante <i>carS</i> obtenido por NG	IMI58289	Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987
SG39	mutante <i>carS</i> obtenido por NG	IMI58289	Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987
SG256	complementante de SG39 por reemplazamiento del alelo <i>carS</i> mutante por un alelo silvestre	SG39	Esta Tesis

**Tabla M.2. Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae***

Estirpe	Genotipo	Referencia
Y187	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4<math>\Delta</math>, gal80<math>\Delta</math>, met<math>^{-}</math>, URA3 : : GAL1UAS-GAL1TATALacZ MEL1</i>	Harper et al., 1993
Y2HGold	<i>MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4<math>\Delta</math>, gal80<math>\Delta</math>, met<math>^{-}</math>, MEL1</i>	Guthrie y Fink, 1991

### 1.3. Estirpes de *Escherichia coli*

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5 $\alpha$	<i>F<sup>-</sup> end A1, hsdR17 (rK<sup>+</sup> mK<sup>-</sup>) supE44 thi-1 gyrA96 recA1 relA1 DlacU169 [F80cl lacZDM15] 1<sup>-</sup></i>	Hanahan, 1983
BL21	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>b</sub>(r<sub>b</sub><sup>-</sup>, m<sub>b</sub><sup>-</sup>) dcm gal <math>\lambda</math> (DE3).</i>	Studier y Moffatt, 1986
HB101	<i>F<sup>-</sup> mcrB mrr hsdS20(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm<sup>R</sup>) glnV44 <math>\lambda</math><sup>-</sup></i>	Boyer y Roulland-Dussoix, 1969

## 2. Plásmidos

### 2.1. Vectores de clonación

pGEM-T easy: plásmido abierto con el gen de resistencia a ampicilina con timinas en los extremos 3' para facilitar la clonación de productos de PCR. Contiene un gen *lacZ* con un sitio de clonación múltiple en el inicio de la secuencia codificante que no interrumpe la pauta de lectura del gen. El X-gal es metabolizado por la beta-galactosidasa y da como resultado un producto de color azul que se acumula dentro de la bacteria. Así, las bacterias que llevan el plásmido con un inserto de interés darán lugar a colonias blancas, puesto que se ha interrumpido el gen *lacZ* y las que no los lleven, colonias azules (selección azul-blanca).

pGEX-4T-3: Vector de sobreexpresión que permite fusionar la proteína glutatión-S-transferasa (GST) al extremo carboxilo de la proteína de interés. La expresión es controlada por la proteína LacI, y es inducible por IPTG.

pGBT10 : Vector de expresión de GAL4, que contiene su dominio de unión a ADN para fusión con otras proteínas y expresión en *S. cerevisiae*. La proteína de fusión se expresan de forma constitutiva bajo el promotor ADH1. El vector lleva la resistencia a ampicilina para selección en *E. coli* y el marcador TRP1 para selección en cepas adecuadas de *S. cerevisiae*. Para replicación en la levadura incluye el origen de replicación de 2  $\mu$ .

pGBKT7: Similar a pGBT10, pero con un gen de resistencia a kanamicina en lugar de ampicilina para la selección en *E. coli*.

pGADT7: Vector de expresión de GAL4, que contiene su dominio de activación para fusión con otras proteínas y expresión en *S. cerevisiae*. Contiene una señal N-terminal de localización nuclear SV40 que dirige la proteína al núcleo de la levadura. El vector también contiene un gen de resistencia a ampicilina para selección en *E. coli* y un marcador LEU2 para selección en levadura. Para replicación en la levadura incluye el origen de replicación de 2  $\mu$ .

## 2.2. Plásmidos construidos

pMAC2-7: Derivado del vector pGEX-4T-3. Lleva el gen *carS* de *F. fujikuroi* fusionado en fase al gen de la GST. El gen *carS* se amplificó por PCR con los cebadores carS-1F y FfcarS-Sall-stop-R, que contienen las dianas para las enzimas *Bam*HI y *Sall*, respectivamente.

pMAC3: Derivado de de pGBT10. Lleva el gen *carS* fusionado en fase al dominio de unión a ADN de GAL4. El gen *carS* se amplificó por PCR con los cebadores carS-1F y FfcarS-Sall-stop-R, que contienen dianas para las enzimas *Bam*HI y *Sall*, respectivamente.

pMAC4: Derivado de de pGBKT7. Lleva el gen *carS* de *F. fujikuroi* fusionado en fase al dominio de unión a ADN de GAL4. El gen *carS* se amplificó por PCR con los cebadores carS-1F y FfcarS-Sall-stop-R, que contienen dianas para las enzimas *Bam*HI y *Sall*, respectivamente.

pMAC5: Derivado de de pGADT7. Lleva el gen *carS* de *F. fujikuroi* fusionado en fase al dominio de activación de GAL4. El gen *carS* se amplificó por PCR con los cebadores carS-2R y carS-1F, que contienen dianas para la enzima *Bam*HI.

pMAC6: Derivado de pGBT10. Lleva el gen *wcoA* de *F. fujikuroi* fusionado en fase al dominio de unión a ADN de GAL4. El gen *wcoA* se amplificó por PCR con los cebadores wcoA-7F y wcoA-6R, que contienen dianas para la enzima *Not*I.

pMAC7: Derivado de pGBKT7. Lleva el gen *wcoA* de *F. fujikuroi* fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4. El gen *wcoA* se amplificó por PCR con los cebadores wcoA-7F y wcoA-6R, que contienen dianas para la enzima *Not*I.

pMAC8: Derivado de pGADT7. Lleva el gen *wcoA* de *F. fujikuroi* fusionado al dominio de activación del promotor gal. El gen *wcoA* se amplificó por PCR con los cebadores wcoa-4R y wcoA-5F, los cuales contienen dianas para la enzima *Bam*HI.

En la construcción de los plásmidos, los productos de PCR se digirieron con las enzimas indicadas, y se ligaron con el vector abierto con las mismas enzimas.

### 3. Medios y condiciones de cultivo

#### 3.1. Medios y condiciones de cultivo para *F. fujikuroi*

Medio mínimo DG: la composición por litro es 30 g de glucosa, 3 g de  $\text{NaNO}_3$ , 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g de KCl, 2 mL de solución de microelementos (10 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 mg  $\text{CuSO}_4$ , 20 mg  $\text{FeCl}_3$ , 20 mg  $\text{NaMoO}_4$  y 2 mg de  $\text{ZnSO}_4$ ) (Avalos et al., 1985). En caso de medio sólido se añadieron 16 g de agar.

Medio de esporulación: la composición por litro es 10 g de glucosa, 0,1 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1g de  $\text{KPO}_4\text{H}_2$ , 0,5g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , y 16 g de agar. Este medio se usó siempre en su forma sólida.

Los micelios se cultivaron a 30°C en matraces de 500 mL con 100 mL de medio líquido durante 3 días en agitación, y posteriormente fueron pasados a placas para aplicar los tratamientos de choque térmico, iluminación o estrés oxidativo.

Para la obtención de esporas se incubaron durante 8-10 días a 22°C bajo luz blanca cajas de medio sólido EG inoculadas mediante siete pinchazos equidistantes con palillos estériles.

#### 3.2. Medios y condiciones de cultivo para *E. coli*

LB: la composición por litro es 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl. Se debe el pH de la mezcla final a 7 (Sambrook y Russell, 2001).

LB ampicilina: El medio LB fue suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 mg/L.

SOB: Para un litro de medio se añadieron a 900 mL de agua destilada 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 0,5 g de NaCl. Se añadieron a continuación 10 mL de una solución de KCl 250 mM, se ajustó el pH a 7 con NaOH, se completó el volumen hasta 1 L y se esterilizó en autoclave. Tras esto, se añadieron 5 mL de  $\text{MgCl}_2$  2M (Sambrook y Russell, 2001)

Medio M9 5X: la composición por litro es 33.9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 15 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , y 2.5 g NaCl.

NCE 50X: Para un litro se disuelven 197 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 323 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 175 g  $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Se añaden unas gotas de cloroformo para su conservación y se almacena a 4°C.

NCE 1X líquido. Para un litro de medio se mezclan 16 mL de solución de sales NCE 50x, 800  $\mu\text{L}$  de 1 M  $\text{MgSO}_4$  y 3,2 mL de glucosa 50X.

En caso de medio sólido se añadieron 16 g de agar por litro. Las estirpes bacterianas se cultivaron en estos medios a 37°C o a 22°C.

### 3.3. Medios y condiciones de cultivo para *S. cerevisiae*

YPD: la composición por litro es 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de glucosa. Para solidificar el medio se añadieron 10 g de agar.

SD: la composición por litro es 1,5 g de YNB (Yeast nitrogen base), 5 g de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , 20 g de glucosa y 18 g de agar. Para el escrutinio de interacciones por doble híbrido se usaron aureobasidina a una concentración final de 100 ng/mL y X-alfa-Gal a una concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Suplemento de aminoácidos: Se usó una mezcla drop-out que contenía todos los aminoácidos menos triptófano, leucina, histidina y adenina.

### 3.3 Recogida de esporas y mantenimiento de estirpes

Las esporas se recogieron añadiendo a cada caja de Petri agua destilada estéril y restregando con una espátula. Las suspensiones de esporas se filtraron utilizando filtros de borosilicato, se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en volúmenes adecuados. Tras determinar la concentración de esporas en una cámara de Burker se pasaron a glicerol 20% (v/v) y se almacenaron a -80°C.

## 4. Ensayo de germinación

Se resuspendieron  $10^7$  esporas de cada estirpe en un volumen de 1 mL de agua con distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , desde 0 a 150 mM. Se mantuvieron 30 min en oscuridad y agitación en un eppendorf de 2 mL a 30°C, tras lo cual se lavaron 2 veces con agua estéril, centrifugando en cada paso 5 min a 3000 g. A continuación se sembraron distintas diluciones en medio DG con distintas cantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tras 7

días en oscuridad y 22°C se contabilizó el número de colonias obtenidas en cada caja y se calculó el porcentaje de germinación a partir de un control tratado con agua.

## **5. Extracción de ácidos nucleicos**

### **5.1. Extracción de ácidos nucleicos**

Para extracción de ADN genómico, se usó el kit GenElute Plant Genomic DNA miniprep (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las extracciones se usaron posteriormente para su uso como molde en reacciones de PCR.

Para uso en medidas de expresión génica mediante RT-PCR, las extracciones de ARN se realizaron con el kit RNAeasy mini (Qiagen), según las especificaciones detalladas en el kit para muestras fúngicas. Las muestras destinadas a RNA-seq se extrajeron con Trizol (Invitrogen) usando el protocolo descrito por el fabricante.

### **5.2. Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos**

Para cuantificar las concentraciones de plásmidos purificados, ADN genómico y ARN total, se usó un equipo Nanodrop (Coleman Technologies Inc., Orlando, Florida, EEUU). Las concentraciones de fragmentos de ADN purificados y disueltos en pequeños volúmenes de agua se estimaron en gel de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001). La fluorescencia de bandas, separadas en gel, se comparó con las de marcadores de tamaños y concentraciones conocidas.

## **6. Manipulación y tratamientos de ácidos nucleicos**

### **6.1. Tratamiento con ADNasa**

Para eliminar el ADN de las muestras de ARN para ensayos de RT-PCR, se utilizó el kit rDNase I, Rnase free (USB), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello el ARN se mezcló con 2 unidades de ADNasa I, tampón comercial y agua. La mezcla se incubó 15 min a 25°C. Seguidamente se añadieron 2 µL de solución de STOP y se incubó 10 min a 65°C.

Para las muestras destinadas al análisis de RNA-seq se usó el kit de Macherey-Nagel según las especificaciones del fabricante, ya que proporciona unas características de calidad más adecuadas para el ensayo en la obtención de la muestra



final. Se partió de 100 ug, y se le añadieron 100  $\mu$ L de una mezcla de tampón y etanol 96%. Las muestras se pasaron por las columnas de purificación, y se centrifugaron seguidamente a 11.000 g durante 30 segundos. Se descartó el sobrenadante y se añadieron a la columna 350  $\mu$ L de tampón “membrane desalting”, Se centrifugó 1 minuto a 11.000 g y una vez seca la columna se le añadió la ADNasa y se dejó actuar durante 15 min a 25°C. Después se lavó la columna con tampón comercial con etanol 96%, y se eluyó finalmente con 60  $\mu$ L de agua calidad milliQ.

## 6.2. Síntesis de ADNc

La mezcla de ARN, oligo dT y agua se incubó a 70°C durante 5 min y seguidamente se colocó en hielo. A continuación se agregaron el tampón de la retrotranscriptasa, dNTPs, la retrotranscriptasa, y agua hasta completar un volumen final de 25  $\mu$ L, según las instrucciones del fabricante (Roche). La mezcla se incubó a 42°C durante una hora. El ADNc obtenido fue posteriormente usado para amplificación por PCR.

## 6.3. Tratamiento con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN plasmídico se realizaron en volúmenes de 20  $\mu$ L durante al menos 1 hora, a 37°C. Las enzimas de restricción se usaron siguiendo las recomendaciones y los tampones del fabricante. Se purificaron posteriormente los fragmentos resultantes a partir de geles de agarosa.

## 6.4. Desfosforilación de extremos de ADN

En algunos casos, los grupos fosfato de los extremos 5' de los fragmentos de ADN se eliminaron para evitar posibles religaciones del vector de clonación linearizado con las enzimas de restricción correspondientes. El tratamiento con fosfatasa alcalina (Roche) del vector digerido se realizó incubando 20 ng de vector purificado con 2,5  $\mu$ L de tampón de la fosfatasa, 1  $\mu$ L de enzima (1U/ $\mu$ L) y 15  $\mu$ L de agua calidad MilliQ durante una hora a 37°C. Tras esto, la enzima se desactivó a 65°C durante 10 min.

## 6.5. Ligación

Para las ligaciones de fragmentos de ADN se usó la ligasa de ADN del bacteriófago T4 (Roche) y su correspondiente tampón con dNTPs. El inserto de ADN se añadió en una proporción 1:1 ó 3:1 con respecto al vector, según las recomendaciones del fabricante. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 14-16 h a 16°C.

#### 6.6.. Electroforesis de ácidos nucleicos

Las muestras de ADN se separaron en geles de agarosa (Agarosa D1 baja EEO, Pronadisa) a una concentración que osciló entre 6 y 10 g/L según los tamaños de los fragmentos. Las electroforesis se llevaron a cabo en tampón TAE 1X (40 mM Tris acetato y 1 mM EDTA) (Sambrook y Russell, 2001)

Como marcadores de tamaño de los fragmentos de ADN se usó ADN del fago Lambda digerido con HindIII o una escalera de marcadores de origen comercial. Las bandas de ADN se visualizaron con bromuro de etidio presente en el propio gel de agarosa.

#### 6.7. Secuenciación de ADN

Se obtuvieron muestras de ADN plasmídico por miniprep usando el Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit y se mandaron para su secuenciación a la empresa StabVida (Portugal).

### 7. RT-PCR a tiempo real

Los ensayos de RT-PCR se llevaron a cabo en dos pasos, con el kit “Light cycler SYBR Green Master I” (Roche). Las muestras contenían 50 ng de ARN (2 µL a una concentración de 25 ng/µL) y se mezclaron con 0,4 uM de los cebadores directo y reverso (0,4 µL de soluciones 10 uM de cada uno), 5 µL de 1x SYBR Green I Master, que incluye Taq polimerasa, el tampón de reacción, la mezcla de dNTPs, y MgCl<sub>2</sub>. El volumen final para la muestra fue de 10 µL. El programa usado para la amplificación de ADNc consistió en una preincubación de 5 min a 95°C, y 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 60°C y 10 segundos a 72°C. Los cebadores usados en los análisis se describen en la tabla M.4.

**Tabla M.4. Cebadores empleados para las cuantificaciones de ARNm mediante RT-PCR**

Cebador	Secuencia 5' -> 3'
RTcarRA-1F	CAGAAGCTGTTCCCGAAGACA
RTcarRA-1R	TGCGATGCCCATTTCTTGA
RTcarB-1F	TCGGTGTCGAGTACCGTCTCT
RTcarB-1R	TGCCTTGCCGGTTGCTT
Tub-2F	CCGGTGCTGGAAACAACG
Tub-2R	CGAGGACCTGGTCGACAAGT
RtFfcarS-1F	GATACCCGGCGGAAAGGTTA
RtFfcarS-1R	CTGACAGTCCATTTTCAGCGC
RT-Bglucosidasa-1F	ACCGAAGAATGGCACTCATGT
RT-Bglucosidasa-1R	CCGCGTCCTACGCAGATG
RT-ArginiltRNA-1F	TGCCAAGAACCATAACCGAAGT
RT-ArginiltRNA-1R	CATGGGCCATGAAGATATTGC
RT-Ringfinger-1F	GCTCGGAAGCGCGTTCT
RT-Ringfinger-1R	GCACATGAACCAAGTCCACAA
RT-Cwh43-1F	CACCATCGGTCCCAATCTG
RT-Cwh43-1R	TGTGAGCGAGAAGTCGGGTAT
10474-F	GCTGCAAGGCGACCTATTTTC
10474-R	CCGACTTCCTGCCATGATAAA
11438-F	GCCGCGTCGCTAGCAA
11438-R	AGGCGAAAACGCTCAAGC
11472-F	TTTCTCGCCTTCGACACTCA
11472-R	TTCTCGCATGCAGCATGATATC
11706-F	TGGTGTTGACGTCTCCAAGCT
11706-R	GAGATCACTGCCTCGGAAGGT
06807-F	CCCCAAACGTTACGTCAACTG
06807-R	GCATAGCATTGACCAAGTTCTGA
05128-F	GCGCCTTCAGCAACAGACA
05128-R	TGACGGTCTGATTCGTAGGATTG
03451-F	GTGAGAAGATCCATCGTTTCGAT
03451-R	ACCGCGGGCGTGAAC

03407-F	CTCCCAACAGCTTCGCTTACA
03407-R	TGTTGTCGCTGACCTGATACG
02216-F	TTCTCGCCATCGAACTTGGT
02216-R	TGCGAGCCTGAAGCATTG
14667-F	CAATGGGCAACCAAGTGAGA
14667-R	CCGCCGTTGCTTTTCC
10321-F	GCTCGCAACCCGTC AATT
10321-R	ACGGCGACTTTGTTGATTAGGT
09320-F	CAACGATGAGGACCGCTTTC
09320-R	AGTCGCGTGGCCGATTT
09119-F	CCCGGAACCGTTCAATACTG
09119-R	TTATCTCCGTTCTGAGCCATCA
01993-F	AATCCATCAACCCTCCTCAGATC
01993-R	TCTTTGTTCTGCTGGGTGCTT

## 8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### 8.1 Enzimas y condiciones

Para las reacciones de PCR sobre ADN genómico o plasmídico se emplearon varias polimerasas de ADN dependiendo del fin de cada reacción. Se usaron las enzimas “Ecotaq” (Biotaq, Bioline) para comprobaciones y “Expand High Fidelity” (Roche) para clonaciones y secuenciación.

Los componentes de la reacción se usaron a las concentraciones habituales en los protocolos estandarizados de PCR (250 mM de cebadores, 10 mM de dNTPs, y tampón con magnesio y polimerasa según especificaciones del fabricante). Para llevar a cabo la reacción (desnaturalización, hibridación y amplificación), los programas de amplificación (temperaturas, tiempos) variaron según el gen a amplificar y los cebadores utilizados. Los cebadores empleados en las reacciones de PCR de esta Tesis se describen en la tabla M.5.

**Tabla M.5. Cebadores empleados en las reacciones de PCR**

Cebador	Secuencia 5' -> 3'
CarRAG-2R	GGCAGGATCCCAGCCCATTTTGACAAAG
CarRAG-4F	ATGTGGCTGAGACATTGACG
CarRAG-4R	GCGATTGATGCTACCTACGTC
CarRAG-5R	CCAATAACGGTGAGCACAAGC
FfcarS-SalI-stop-R	CAGGTGACGGGCAAGCATTGTCAATCAGA
carS-1F	ACGGGATCCATGTCCTCAGAAGGCACGTC
OX2	ATCATCAGCATCAGGAGGTG
OX3	GAGGCCGATATATGCTACGA
OX4	TCCTCGAGGCTAACATCGTC
OX5	CCTTGACGGATACATCGTCG
OX18	CGATTTGCATGTGATTCTGGG
pGEX 5' sequencing primer	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pGEX 3' sequencing primer	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
wcoA-5F	GGCCGGATCCCTATGGATGGCTACTAC
wcoA-4R	ATCCGGATCCTCAAGGCTGACTCGTCT
wcoA-6R	GTAGCGGCCGCTCAAGGCTGACTCG
wcoA-7F	GATGCGGCCGCATGGATGGCTACTA

## 8.2. Purificación de productos de PCR

Los fragmentos de ADN de interés se visualizaron en el gel con una lámpara de UV de mano y se separaron cortando pequeños bloques de agarosa, de los cuales se extrajo el ADN empleando columnas GFX™ PCR, (ADN and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare), utilizadas según las instrucciones del fabricante.

## 9. Transformación de *E. coli*

### 9.1 Transformación clásica

Para la preparación de bacterias competentes, se utilizó el método descrito por Inoue et al. (1990). Partiendo de un cultivo de *E. coli* en fase estacionaria, se

inocularon 3 matraces de 500 mL con 200 mL de medio SOB (con densidades ópticas crecientes) y se incubaron a 22°C de 10 a 12 h en agitación. Una vez que el cultivo alcanzó una absorbancia de 0,5, se enfrió en hielo durante 10 min, se centrifugó a 3.900 rpm durante 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Seguidamente las células se resuspendieron en tampón ITB (MnCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 55 mM, CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 15 mM, KCl 250 mM y PIPES 10 mM, pH 6,7). Finalmente se añadió 1,5 mL de DMSO, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para la transformación de *E. coli* DH5α con los distintos plásmidos y construcciones, se utilizaron 100 µL de células competentes, que se incubaron con el ADN correspondiente 10 min en hielo. Posteriormente la mezcla se sometió a choque térmico a 42°C durante 90 segundos. Tras ello, se volvió a incubar 3 min en hielo y seguidamente se añadieron 900 µL de LB. Dicha mezcla se incubó en agitación a 37°C durante 1 hora. Finalmente se sembraron distintas diluciones en cajas de Petri con medio selectivo LB ampicilina y se incubaron a 37°C, durante 12-14 h.

## 9.2. Transformación por electroporación

Para la obtención de células electrocompetentes se inocularon 5 ml de un preinóculo de células de *E. coli* BL21 o HB101 a 500 ml de medio LB en un matraz Erlenmeyer y se incubó en agitación hasta alcanzar una absorbancia de 0,4 a 600 nm. Posteriormente, las células se centrifugaron durante 10 min a 3.500 rpm a 4°C, se lavaron resuspendiéndolas en agua destilada estéril fría, se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones, para eliminar las sales procedentes del medio y se resuspendió el precipitado en agua y se usaron inmediatamente. Para su congelación se resuspendieron en glicerol 10% (v/v) y se guardaron a -80°C.

En la electroporación, el plásmido a transformar se mezcló con 40 µL de bacterias electrocompetentes, se enfrió en hielo y la mezcla se introdujo en una cubeta previamente enfriada. Se aplicó un pulso de 2,5 kV y 25 µF en un electroporador BTX Electroporator 600 (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, EEUU). Se ajustó para 200 Ω de controlador de pulso y 125 µF de extensión de capacidad. Inmediatamente tras el pulso, se añadió 1 ml de SOB a las bacterias y se incubaron durante 30 min a 37°C en agitación. Se sembraron distintas diluciones en cajas con medio selectivo LB con ampicilina y se dejaron crecer 12-14 h a 37°C.

### 9.3. Transformación de *S. cerevisiae*

Las células se obtuvieron a partir de un preinóculo incubado toda la noche en medio YPD. A la mañana siguiente se usaron para inocular cultivos de 100 mL YPD, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,5-0,6. Las células se centrifugaron y se lavaron primero con agua destilada estéril y seguidamente con una solución de 100 mM de acetato de litio en tampón TE (Tris 10mM, EDTA 1mM pH 7,5). Tras una nueva centrifugación, se volvieron a resuspender en 2 mL de la misma solución y se mantuvieron a 30°C una hora en agitación. Para cada transformación se mezclaron 150 µL de células competentes, 500 µL de PEG3350 al 50% en acetato de litio 0,1M, 10 µL de espermatozoos de salmón (10 mg/mL) y 10 µL de ADN plasmídico. La mezcla se incubó a 30°C durante 30 min en agitación, tras lo cual se sometieron a choque térmico a 42°C durante 20 min. Finalmente las células se lavaron con agua estéril y se sembraron diferentes diluciones en medio de cultivo selectivo con los requerimientos adecuados.

## 10. Extracción de ADN plasmídico

### 10.1. Extracción de plásmidos de *E. coli*

Para la extracción de plásmidos a escala “miniprep” se utilizaron dos métodos. En ambos casos se inoculó un tubo con 3 mL de LB ampicilina con una colonia candidata a contener el plásmido de interés y se incubó a 37°C durante 12-14 h en agitación. Tras la incubación, se centrifugaron los 1,5 mL del cultivo a 13.500 rpm durante 3 min y se eliminó el sobrenadante.

El primer método fue mediante lisis alcalina (Jones et al. 1990). Las células se resuspendieron en 200 µL de una solución de resuspensión (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8 y 100 mg/mL de RNasa) conservada a 4°C. Las células se lisaron con 200 µL de una solución desnaturizante (SDS 1%, NaOH 0,2M) preparada justo antes de su uso. Se agitó el tubo sin vortex hasta que se aclaró la suspensión y se añadieron a continuación 150 µL de una solución neutralizante (acetato potásico 1,32 M, pH 4,8). Se centrifugó de nuevo para eliminar los restos de membranas, las proteínas y el ADN cromosómico precipitado y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Para precipitar el ADN plasmídico se añadieron al tubo 500 µL de isopropanol

y se centrifugó 10 min a 13.500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 200  $\mu$ L de etanol 70% para lavar el precipitado. Por último, se centrifugó a la misma velocidad durante 5 min, se dejó secar el ADN precipitado a temperatura ambiente y se resuspendió en 20-50  $\mu$ L de agua calidad MilliQ.

El segundo método de extracción de ADN plasmídico se basa en la purificación del ADN por afinidad a columnas. Se emplearon los materiales y soluciones proporcionados por el kit Wizard Plus SV Miniprep (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU). Este método se usó para la obtención de ADN plasmídico para secuenciación.

## 10.2. Extracción de plásmidos de *S. cerevisiae*

Para el extraer plásmidos de *S. cerevisiae* se partió de un preinóculo incubado durante toda la noche en medio selectivo. Por la mañana las células se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min, se resuspendieron y lavaron con agua destilada estéril. El precipitado se resuspendió en 640  $\mu$ L de sorbitol 0,9 M y 0,1M EDTA pH 8. Seguidamente se añadieron 6,4  $\mu$ L de beta-mercaptoetanol y 10  $\mu$ L de zimoliasa 20T (20 mg/mL). La mezcla se incubó 1 h a 37°C. Tras este tiempo se centrifugó y se continuó como un protocolo normal de extracción de ADN plasmídico de *E. coli* por lisis alcalina, en el paso de adición de la solución desnaturalizante (descrito en el apartado 10.1)

## 11. Extracción de proteínas totales

### 11.1 Extracción de proteínas totales de *E. coli*

Los cultivos celulares de la estirpe BL21 de *E. coli* recogidos tras la inducción con IPTG en las condiciones adecuadas, se centrifugaron a 13000 rpm, 4°C durante 10 min para precipitar las células. Estas se resuspendieron en 300  $\mu$ L de tampón Laemmli 2x (composición en el apartado 11.3) y se hirvieron a 99°C durante 10 min. Se centrifugó a 13000 rpm para descartar restos celulares y el sobrenadante se utilizó directamente para su separación en electroforesis en geles de poliacrilamida..



### 11.2 Extractos totales de proteínas de *E. coli* por sonicación

Para purificar la proteína de fusión GST-CarS, las bacterias se recogieron mediante centrifugación como se indica en el apartado 5.1, se resuspendieron en 1 mL de tampón de lisis (Tampón PBS 1X, Tritón X-100 1% (v/v)). Las células se lisaron mediante sonicación, con 4 pulsos de 15 s en intervalos de 1 min entre cada pulso, y manteniendo las muestras en hielo. Finalmente se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm y 4°C separándose así los restos celulares de la fracción soluble.

### 11.3 Extractos de proteínas totales de *Fusarium*

Para obtener los micelios de cada estirpe se inocularon  $10^6$  esporas en matraces de 500 ml con 100 mL de medio DGn. Se incubaron los matraces durante tres días a 30°C en oscuridad a 150 rpm. Tras esto, los cultivos fueron iluminados bajo luz blanca ( $5 \text{ Wm}^{-2}$ ) en el mismo matraz en agitación, o pasando a una placa según el experimento. Los micelios obtenidos se filtraron, se lavaron con agua destilada y se congelaron en nitrógeno líquido. Posteriormente se trituraron, hasta obtener un polvo fino, en Fast-prep y con 500 mL de tampón A50 con DTT 0,25 mM y con los inhibidores de proteasas PMSF 1 mM, pepstatina 1,5 mM y leupeptina 1 mM. Tras ello, se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min y se recogieron los sobrenadantes.

Tampón A50: HEPES 25 mM, KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol 10%

Tampón Laemmli (4x): Tris-HCl 240 mM pH 6,8, SDS 8%, glicerol 40%, beta-mercaptoetanol 4%, azul de bromofenol 0,02% .

## 12. Purificación de proteínas de fusión

### 12.1. Optimización de las condiciones de inducción

El plásmido pMAC2-7 con la fusión GST-CarS se expresó en la cepa *E. coli* BL21. Se partió de un inóculo de 5 mL con medio selectivo LB Ampicilina crecido durante 12-14 h, a 37°C en agitación. Tras esto se inocularon matraces de 100 ml con 25 mL del mismo medio selectivo con diluciones 1:100 del preinóculo y se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,7-0,8. En ese momento se tomó una alícuota de 1 mL como control negativo no inducido y seguidamente se indujeron los

cultivos añadiendo IPTG hasta una concentración final de 1 mM. A partir de entonces se tomaron muestras cada 60 min, durante 5 h del cultivo incubado a 22°C con una agitación de 9000 rpm. La temperatura empleada fue para evitar la formación de cuerpos de inclusión en las bacterias.

Tras analizar la cinética de inducción de la proteína de fusión GST-CarS, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción de éstos con azul de Coomasie, se escogieron las condiciones óptimas de inducción. Se utilizaron éstas para realizar volúmenes de cultivo mayores (250 mL en matraces de 1 L).

#### 12.2. Obtención de extractos crudos de proteínas de *E. coli*

Se inoculó la estirpe BL21 *E. coli* transformada con el plásmido pMAC2-7 (GST-CarS) en 5 mL de medio LB con ampicilina y se cultivó durante 12-14 h en agitación a 37°C. Al día siguiente, se precipitaron las células y se resuspendieron en 250 mL de medio fresco y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0,6 a 0,7. Para inducir la expresión de la proteína se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM. Tras 4 h de incubación a 22°C, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en el tampón de equilibración PBS-T ( $KH_2PO_4$  10mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%). Las células se sonicaron mediante 5 pulsos de 15 s, con una intensidad del 50%. Los lisados obtenidos se centrifugaron a 12000 rpm y 4°C para eliminar restos celulares y los sobrenadantes se guardaron a -80 °C.

#### 12.3. Purificación de la proteína GST-CarS expresada en *E. coli*

La purificación de la proteína GST-CarS se realizó mediante la utilización de una resina de afinidad de glutatión-agarosa, siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma, St Louis, EEUU). Se equilibró la resina y se incubó con el extracto de proteínas totales de *E. coli* durante 1 h a 4°C. Posteriormente la proteína GST-CarS se eluyó en 1 mL de tampón de elución (glutatión reducido 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 9) y tras las centrifugaciones se recuperaron los sobrenadantes. Posteriormente se conservaron los distintos eluidos a -80°C y -20°C.

#### 12.4. Cuantificación de proteínas

Se utilizó albúmina de suero bovina (BSA) para realizar una curva estándar-con seis concentraciones crecientes de BSA desde 0,06 a 2 mg/mL. La concentración de

proteínas de los extractos de *Fusarium* como de la proteína de fusión purificada de *E. coli* se cuantificó usando el método de Bradford (Bradford, 1976) con el reactivo de Bradford de Bio-Rad.

### 12.5. Precipitación de proteínas

La precipitación de proteínas se realizó en tubos Eppendorf de 1,5 mL añadiendo 1/10 de volumen de una solución de ácido tricloroacético al 100% (p/v) en agua destilada a 4°C. La mezcla se incubó 10 min a 4°C y posteriormente se centrifugó en una centrífuga Eppendorf a su máxima velocidad durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó y centrifugó con acetona previamente enfriada a -20°C. El último precipitado se secó en una campana de flujo laminar y se resuspendió en el volumen deseado de tampón de carga Laemmli, descrito en el apartado 11.3.

## 13. Electroforesis de proteínas

Para asegurar la presencia de proteína de interés los lisados celulares totales se sometieron a electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida SDS-PAGE siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Las cantidades de cada muestra se ajustaron para cargar en cada pocillo del gel de acrilamida la misma cantidad de proteína. Las muestras se hirvieron durante 5 min a 99°C en tampón Laemmli e inmediatamente después se pusieron en hielo durante al menos otros 5 min antes de ser cargadas en el gel.

Las electroforesis en gel de acrilamida se realizaron utilizando el sistema mini-PROTEAN Tetra Cell de Bio-Rad en geles de 1,5 mm de grosor. Los geles se utilizaron para teñirlos con azul Coomassie o para transferencia semiseca de las proteínas a membranas de nitrocelulosa. Los geles se prepararon usando un gel concentrador al 4 % y un gel separador al 10 %. Como marcadores de pesos moleculares se utilizó el Precision Plus Protein TM Standards All Blue (Bio-Rad). Las condiciones de las electroforesis fueron 180 V, 400 mA y 40 min.

Gel empaquetador: 4% acrilamida:bisacrilamida (29:1), Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 0,1% , 0,5% (v/v) APS 10% y TEMED 0,2% (v/v).

Gel separador: 10% acrilamida:bisacrilamida (29:1), Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%, 0,5% (v/v) APS 10% y TEMED 0,2% (v/v) .

Tampón de electroforesis (10x): Tris base 0,4 M, glicina 1,2 M , SDS 1% .

### 13.1 Tinción con azul de Coomassie

Una vez eliminada la parte del gel empaquetador, los geles se sumergieron en solución de tinción con azul de Coomassie (Coomassie Brilliant blue R-250) durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se retiró la solución de tinción y se lavó el gel en solución de destinción donde se mantuvo durante unas horas en agitación a temperatura ambiente.

Azul de Coomassie: metanol 40%, ácido acético 10%, azul de Coomassie 0,1% (p/v)

Solución de destinción del azul de Coomassie: 40% metanol, 10% ácido acético

## 14. Análisis de proteínas mediante western

### 14.1. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Para la transferencia semiseca a membranas de nitrocelulosa se recortaron 6 trozos de papel Whatman y un trozo de membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose Transfer Membrane Protean Schleider & Schnell Bioscience BA83 0,2 um Hybond ECL GE Healthcare) del mismo tamaño del gel y se sumergieron en tampón de transferencia durante 15 min.

Se montó la membrana de nitrocelulosa sobre el gel de acrilamida con 3 papeles Whatman bajo el gel y tres sobre la membrana y se colocaron en un sistema de transferencia semiseca (Biorad). Tampón de transferencia semiseca: Tris base 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20%, SDS 0,05%, pH 8,3.

### 14.2. Tinción de membranas de nitrocelulosa

Al finalizar la transferencia, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau S para comprobar que las proteínas se habían transferido adecuadamente a la membrana. El exceso de Ponceau S se eliminó lavando las membranas con agua destilada. Las membranas teñidas se lavaron durante 10 min con agua para retirar el colorante.

Ponceau S: Ponceau S 0,1% (p/v), ácido tricloroacético 3% (p/v)

### 14.3 Inmunodetección

Las membranas se incubaron durante 2 h en solución de bloqueo (8% p/v leche desnatada en polvo en tampón TBS), en agitación. Los anticuerpos primarios se

añadieron a la solución de bloqueo a las diluciones requeridas, y se utilizaron para incubar las membranas ya bloqueadas, durante toda la noche en el caso de anti-CarS y 1 h en el caso de anti-GST a 4°C en agitación. Terminada la incubación, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con tampón TBS en agitación y a temperatura ambiente. Como anticuerpos secundarios se usaron el anticuerpo Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate (Bio-Rad) y el Goat Anti-mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate (Bio-Rad) a dilución 1:10000. Estuvieron en contacto con las membranas 50 min, a temperatura ambiente y en agitación. Tras la incubación con el anticuerpo secundario las membranas se lavaron con tampón TBS a temperatura ambiente y en agitación.

Para la reacción lumínica se utilizó el kit “Plus Western blotting detection” (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas se colocaron entre dos láminas de acetato y se procedió al revelado manual de las mismas, exponiendo las películas de rayos X a distintos tiempos.

TBS (10X): NaCl 1,55M, Tris base 33 mM, pH 7,5

TBS-T: TBS 1X, Tween 20 0,25% .

Solución de bloqueo: leche desnatada en polvo Difco™ 5% en TBS 1X.

## 15. Ensayos de retardo en gel

Los ensayos de retardo en geles de acrilamida, destinados a detectar interacciones proteína-ADN, se realizaron mezclando distintas cantidades de ADN y proteína. Las muestras se incubaron en el tampón de unión A50 (HEPES-KOH pH 7,9 25 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, poly-[d(I-C)]/poly[d(I-C)] y glicerol 21%) durante 90 min a temperatura ambiente. Tras este tiempo se añadió tampón de carga (0,5x TBE, 20% glicerol, y azul de bromofenol). Como control negativo de proteína se usó BSA (1,125 mg/mL). Las posibles interacciones se visualizaron sometiendo las muestras a electroforesis en geles de acrilamida con proporciones acrilamida-bisacrilamida 19:1 y 29:1. La electroforesis se realizó a 60 V y 10 mA durante 6 h. Una vez finalizada, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (0,5 ug/mL) durante 10 min.

## 16. Fraccionamiento celular

Los micelios previamente congelados se trituraron con ayuda de un mortero. Se añadieron 800  $\mu$ L de tampón A (sorbitol 1M, 7% ficoll (p/v), 20 % glicerol (v/v), 50 mM Tris pH 7,5, 5 mM MgAc, 5 mM EDTA, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT) y se mezcló bien por inversión. Se incubaron 20 min en hielo alternando pulsos en un Vortex. Después se filtró el micelio homogeneizado con ayuda de una gasa estéril y una jeringa de 5 mL. Al filtrado se le agregó lentamente 1,2 mL de tampón B (10 % glicerol, 25 mM Tris pH 7,5, 5 mM MgAc, 5mM EGTA, 0,5 mM DTT) mientras se agitaba lentamente.

Por otra parte se prepararon 300  $\mu$ L de una mezcla 1:1,7 de los tampones A y B en un tubo de 2 mL, y se le agregó todo el filtrado anterior muy lentamente. Después la mezcla se centrifugó a 700 g y 4°C durante 3 min. Se tomaron 120  $\mu$ L del sobrenadante (extracto total) y se añadió el resto a un gradiente de sacarosa (1 M sacarosa, 10% glicerol, 25 mM Tris pH 7,5, 5mM MgAc). La mezcla con el gradiente se centrifugó a 9.200 g y 4°C durante 8 min. Se tomaron de ahí 120  $\mu$ L (extracto citoplasmático) y se descartó el resto. El precipitado obtenido se resuspendió en 75  $\mu$ L de tampón PEB (extracto nuclear).

## 17. Escrutinio de interacción con CarS mediante el sistema del doble híbrido

### 17.1. Genoteca: construcción y conjugación

La extracción de ARN se realizó por duplicado con el kit de Qiagen. Se comprobó la calidad de las muestras de ARN obtenidas, que se consideró muy aceptable para continuar con el protocolo (Fig. M.1).



**Figura M.1: Dos extracciones en paralelo de ARN en condiciones de oscuridad.** El micelio se cultivó durante 3 días en 100 mL de medio DG, se congeló tras su filtración y se almacenó a -80°C. Las muestras contienen 740,8 ng/ $\mu$ L (carril izquierdo) y 819,8 ng/ $\mu$ L (carril derecho).

Tras generar la primera cadena molde de ADNc, se amplificó y se visualizó en un gel de agarosa para corroborar que se había generado ADNc de tamaños muy

diversos que abarcaron aproximadamente desde 7 kb a 500 pb. El ADNc se purificó con columnas “Chroma Spin” (contenidas en el mismo kit), compuestas por una resina para limpieza de sales, solventes, enzimas o proteínas presentes en las muestras. Se generaron aproximadamente 2 ug de muestra tras el paso por la columna.

El plásmido pMAC3, que contiene el gen CarS fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4 (ver sección 2), se introdujo en la estirpe de *S. cerevisiae* YH2Gold. La estirpe obtenida se conjugó con la cepa Y187 que lleva la genoteca de ADNc de *F. fujikuroi*, obtenida en condiciones de iluminación durante 1 hora y construída usando el vector pGADT7.

Para llevar a cabo el escrutinio se inocularon 40 mL de SD –Trp con la estirpe YH2Gold con pMAC3 y se dejó toda la noche a 30°C y 180 rpm. Por la mañana se recogieron las células por centrifugación dejando unos 3 mL de medio y se les agregó 500 µL del cultivo de la genoteca y 40 mL de medio rico. La mezcla se pasó a un matraz Erlenmeyer de 2 L y se incubó durante 20 h a 30°C a 40 rpm. Dichas condiciones mantienen las células en suspensión y favorecen la formación de conjugantes.

Tras ese tiempo las células se recogieron por centrifugación y se lavaron y resuspendieron en 2 mL de agua destilada estéril, para sembrar distintas alícuotas de 200 µL en cajas de Petri de 15 cm de diámetro con medio SD –Trp –Leu –His. Éstas se incubaron a 30°C durante 10 días.

Una vez que se purificaron los clones candidatos, se volvieron a conjugar dichos clones de levadura con la estirpe Y2HGold con pMAC3. Estas conjugaciones se realizaron mezclando una colonia de cada estirpe en un tubo Eppendorf con 0,5 mL de medio rico YPD. La mezcla se incubó a 200 rpm y 30°C durante 12 h y se sembraron posteriormente 100 µL en medio SD –Leu–Trp.

## 17.2 Aislamiento de plásmidos derivados de pGADT7

Después del escrutinio, los plásmidos se aislaron a partir de clones que crecieron en medio sin histidina ni adenina. La preparación de plásmidos se usó para transformar la estirpe de *E. coli* HB101, que es auxótrofa para leucina. Para comprobar la presencia de inserto en los clones, los plásmidos de las bacterias resultantes de transformar con los derivados de pGADT7 se comprobaron mediante

amplificación por PCR con los cebadores 3'AD y T7, y mediante digestión con la enzima *HindIII*.

## 18. Extracción y análisis de carotenoides

Los micelios cultivados en las distintas condiciones en medio líquido DG se congelaron y se liofilizaron, y se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a -20°C hasta su uso. Para cada extracción se usaron aproximadamente 100 mg de micelio de la estirpe silvestre y de su complementante SG256, sin embargo se usaron 10 mg de micelio de los mutantes *carS*. Los carotenoides se extrajeron en tubos de 2 mL empleando un homogeneizador FastPrep (MP Biomedicals), añadiendo a cada tubo una pequeña cantidad de arena de playa y 1 mL de acetona. Los tubos se sometieron a un pulso de 30 s a 6,5 m/s y se centrifugaron después 1 min a 13.000 rpm. El sobrenadante se recuperó y se repitió el paso de extracción hasta que el micelio y la acetona carecieran de color. Los sobrenadantes de acetona se centrifugaron para eliminar los posibles restos de arena y se secaron en una centrífuga de vacío (Eppendorf) a una temperatura inferior a 50°C. Los extractos se disolvieron en hexano y se midió la absorbancia entre 400 y 650 nm en un espectrofotómetro Beckman, DU 640, (Beckman coulter). La concentración total de carotenoides se calculó a partir del peso de la muestra, la dilución empleada, y el valor máximo de absorción de los espectros (aproximadamente a 472 nm) restandoles el valor a 600 nm, usando un coeficiente de extinción molar  $\epsilon$  (1 mg/L, 1 cm) medio de 250.

## 19. Bioinformática

### 19.1 Análisis de estructura y dominios

Las secuencias proporcionados por la empresa Stab Vida se analizaron con el programa informático de alineamiento de secuencias clustalW2 (European Bioinformatics Institute of the European Molecular Biology Laboratory, EMBL-EBI).

Las secuencias de ADN y las informaciones sobre el genoma de *F. fujikuroi* se obtuvieron a través del servidor del Broad Institute ([www.broadinstitute.org](http://www.broadinstitute.org)). Los análisis BLAST y BLASTP se realizaron a través del servidor del NCBI (National Center of Biotechnology and Informatics, [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).



La búsqueda de catalasas de *F. fujikuroi* y proteínas con dominio catalasa se hicieron mediante la plataforma “EnsemblFungi” (<http://fungi.ensembl.org>). De esta fuente se obtuvo la identidad y localización de dominios, utilizados para el diseño de oligos específicos para cada catalasa. Las comparaciones de secuencias y el cladograma de catalasas para *F. fujikuroi* se llevaron a cabo con el programa Clustal Omega a través del servidor <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

## 19.2 Tratamiento de datos de RNA-seq

Las características de las muestras de ARN utilizadas en el análisis RNA-seq se resumen en la Tabla M.6.

**Tabla M.6. Datos de las muestras analizadas en la secuenciación de Illumina para RNA-seq.**

Muestra	Valor RIN	Relación 260/280	Relación 230/260	Concentración (ng/μl)	Ng Totales
Silvestre osc R1	10	2,1	2,45	118	5900
Silvestre osc R2	10	2,1	2,41	201	10050
Silvestre luz R1	9,9	1,99	1,92	183	9150
Silvestre luz R2	10	2,1	2,4	150	7500
SG39 osc R1	10	2,1	2,5	187	9350
SG39 osc R2	10	2,13	2,43	222	11199
SG39 luz R1	10	2,09	2,51	168	8400
SG39 luz R2	10	2,1	2,38	157	7850
SG256 osc R1	10	2,1	2,45	150	7500
SG256 osc R2	10	2,1	2,38	158	7900
SG256 luz R1	10	2,1	2,43	159	7950
SG256 luz R2	10	2,09	2,43	175	8750

Para el análisis estadístico y gráfico de los datos de secuencias se usó el programa Rstudio (versión 3.1.3), basado en *scripts* proporcionados por el Dr. Francisco Romero-Campero (Departamento de Ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial, Universidad de Sevilla) y el programa para análisis de datos Bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)). Para el mapeo y visualización del número de

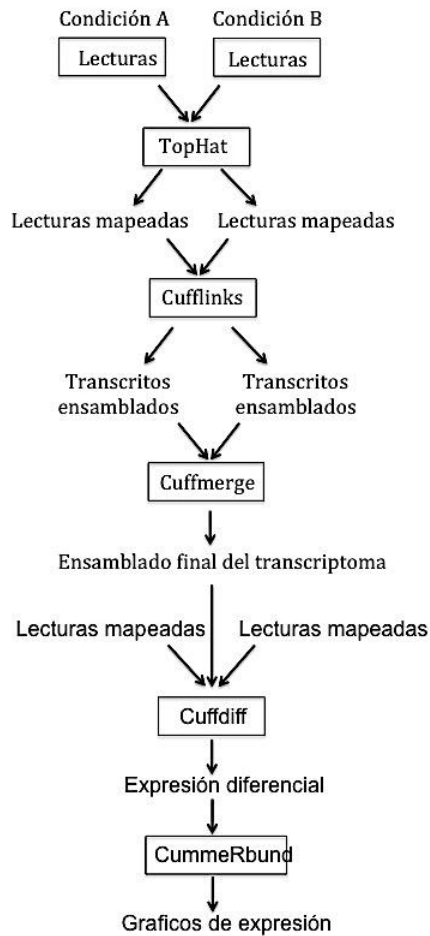
lecturas genómicas de las muestras del ensayo se usó la aplicación IGV (“Integrative genomics viewer” versión 2.3.57).

Para el procesamiento de las muestras se empleó el protocolo de Illumina, que se basa esencialmente en los siguientes pasos:

- a) Enriquecimiento del ARN mediante poli-A: Teniendo en cuenta que una gran mayoría de ARN presente en las células es ribosómico con el enriquecimiento nos aseguramos de que se obtiene una señal buena para el ARN de interés.
- b) Fragmentación de ARN: Tras la purificación, el ARN se fragmenta en trozos de 100 a 300 pares de bases.
- c) Síntesis de ADNc de doble cadena: se lleva a cabo la transcripción inversa de las muestras anteriores con oligo dT.
- d) Uso de adaptadores para los extremos T.
- e) Selección de fragmentos de tamaño similar y posterior amplificación por PCR.

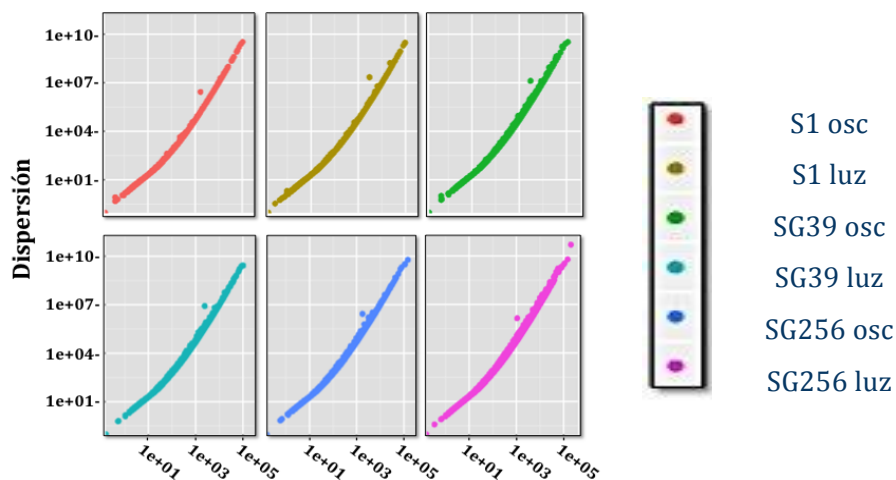
El tratamiento de datos de la secuenciación por la plataforma Illumina se realizó a través de la plataforma CICA (Centro Informático Científico de Andalucía) utilizando el protocolo Tuxedo, con el asesoramiento y colaboración del Dr. Francisco Romero-Campero. Para el control de calidad se usó el paquete de software FastQC. Para el mapeo de lecturas al genoma de referencia de *F. fujikuroi*, el montaje de la transcripción y la expresión diferencial se usaron las herramientas Bowtie, TopHat, Cufflinks y Cuffmerge (Trapnell et al., 2012), utilizando los parámetros que asignan los programas por defecto. En concreto, con la herramienta Tophat se mapearon las lecturas en el genoma de referencia y con la herramienta Cufflinks se ensamblaron los transcritos. Los resultados obtenidos con Cufflinks se integraron con la herramienta Cuffmerge. Los niveles de expresión génica se obtuvieron en FPKM (fragmentos por kilobase de transcritos por cada millón de mapeos) con la herramienta Cuffdiff, el cual aplica una normalización de las lecturas obtenidos en la secuenciación eliminando los sesgos debidos a las diferencias de longitud de los transcritos (Garber et al., 2011) y se determinó la expresión diferencial. El resto del análisis y la visualización de los resultados se realizó a través del paquete CummeRbund, obtenido de la plataforma Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>), que maneja este tipo de archivos a través de *scripts* en lenguaje R.

La cadena completa de procedimientos (“pipeline”) se resume en la Fig. M.2.



**Figura M.2: Cadena de procedimientos en el tratamiento y obtención de datos de RNA-seq desde el sistema de secuenciación de Illumina.** (Modificado de Trapnell et al., 2012)

Con el fin de comprobar la calidad de las secuenciaciones, se analizó la dispersión y el coeficiente de variación al cuadrado (SCV) de las seis muestras. No se observó una sobredispersión sustancial y el SCV no indicó un alto grado de variabilidad entre repeticiones (Fig. M3).



**Figura M.3: Representación de la dispersión entre las distintas réplicas.**

La generación de categorías GO se basó en la anotación automática del genoma de *F. fujikuroi* usando los dominios proteicos detectados por la base de datos de PFAM. La falta de asignación de aproximadamente la mitad de los genes de *F. fujikuroi* dificultó la asignación de los dominios. Entre los detectados se tuvieron en cuenta para la representación (ver Figuras 2.12 y 2.13 del capítulo 2) sólo los que se ajustaron a un parámetro Fischer igual o menor a 0,05. Para la identificación de las asignaciones GO se usó la aplicación REVIGO (<http://revigo.irb.hr>). REVIGO es un servidor web que resume las listas de los términos GO mediante la búsqueda de un subconjunto representativo de los términos, usando un algoritmo de agrupamiento simple que se basa en medidas de similitud semántica (Supek et al., 2011).

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**



## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Adám, A. L., García-Martínez, J., Szucs, E. P., Avalos, J., Hornok, L. (2011) The MAT1-2-1 mating-type gene upregulates photo-Inducible carotenoid biosynthesis in *Fusarium Verticillioides*. FEMS Microbiology Letters 318(1): 76-83.
- Akache, B., Turcotte, B. (2002). New regulators of drug sensitivity in the family of yeast zinc cluster proteins. Journal of Biological Chemistry, 277(24), 21254-21260.
- Alejandro-Durán, E., Roldán-Arjona, T., Ariza, R.R., Ruiz-Rubio, M. (2003) The photolyase gene from the plant pathogen *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* is induced by visible light and alpha-tomatine from tomato plant. Fungal Genetics and Biology, 40(2), 159-165.
- Almeida, E. R., Cerdá-Olmedo, E. (2008) Gene Expression in the Regulation of Carotene Biosynthesis in *Phycomyces*. Current Genetics, 53(3), 129-137.
- Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. Science, 221(4617), 1256-1264.
- Arner, E. S., Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. European Journal of Biochemistry 267(20): 6102-6109.
- Arrach, N., Fernández-Martín, R., Cerdá-Olmedo, E., Avalos, J. (2001) A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(4), 1687-1692.
- Arst, Jr H. N., Cove, D. J. (1973) Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Molecular and General Genetics MGG, 126(2), 111-141.
- Aslam, M., Travis, R. L., Rains, D. W. (1996) Evidence for substrate induction of a nitrate efflux system in barley roots. Plant Physiology 112:1167-1175.
- Aslam, M., Travis, R. L., Rains, D. W., Huffaker, R. C. (1996) Effect of root perturbation and excision on nitrate influx and efflux in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. Physiologia Plantarum, 97(3), 425-432.
- Auer, P. L., Doerge, R. W. (2010). Statistical design and analysis of RNA sequencing data. Genetics, 185(2), 405-416.
- Austwick, P. K. C. (1984) *Fusarium* infections in man and animals. The Applied Mycology of *Fusarium*. 129-140.
- Avalos, J., Cerdá-Olmedo, E. (1987) Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*. Current Genetics, 11(6-7), 505-511.
- Avalos, J., Cerdá-Olmedo, E. (1986) Chemical Modification of Carotenogenesis in *Gibberella fujikuroi*. Phytochemistry, 25(8), 1837-1841.
- Avalos, J., Díaz-Sánchez, V., García-Martínez, J., Castrillo, M., Ruger-Herreros, M., Limón, M.C. (2014) Carotenoids. En: Martín J.F, García-Estrada C, Zeilinger S (eds) Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites. Springer, pp 149-185.
- Avalos, J., Cerdá-Olmedo, E. (2004) Fungal carotenoids production. In Handbook of Fungal Biotechnology Arora, DK (ed) New York, Marcel Dekker, Inc, 367-378.
- Avalos, J., Estrada, A. F. (2010) Regulation by light in *Fusarium*. Fungal Genetics Biology 47, 930- 938.

- Avalos, J., Limón, M. C. (2015) Biological roles of fungal carotenoids. *Current Genetics*, 61(3), 309-324.
- Avalos, J., Mackenzie, A., Nelki, D. S., Bramley, P. M. (1988) Terpenoid Biosynthesis in Cell-Extracts of Wild Type and Mutant Strains of *Gibberella Fujikuroi*. *Biochimica et Biophysica Acta* 966: 257-65.
- Avalos, J., Schrott, E. L. (1990) Photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiology Letters* 66, 295-298.
- Avalos, J., Casadesús, J., Cerdá-Olmedo, E. (1985) *Gibberella fujikuroi* mutants obtained with UV radiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 187-191.
- Avalos, J., Cerdá-Olmedo, E., Reyes, F., Barrero, A. F. (2007) Gibberellins and Other Metabolites of *Fusarium fujikuroi* and Related Fungi. *Current Organic Chemistry*, 11(8), 721-737.
- Awad, H. M., Boersma, M. G., Vervoot, J., Rietjens, I. M. (2000) Peroxidases catalyzed formation of quercetin quinine methide-glutathione adducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 378: 224-233.
- Balan J., Fuska J., Kuhr I., Kuhrová V. (1970) Bikaverin, an antibiotic from *Gibberella fujikuroi*, effective against *Leishmania brasiliensis*. *Folia Microbiologica*, 15(6), 479-484.
- Baldi, P., Long, A. D. (2001) A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics*, 17(6), 509-519.
- Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A., Macino, G. (1996) White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *The EMBO Journal*, 15(7), 1650.
- Bañuelos, M. A., Klein, R. D., Alexander-Bowman, S. J. and Rodríguez-Navarro, A. (1995) A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *The EMBO Journal*, 14(13), 3021.
- Berrocal-Tito, G. M., Esquivel-Naranjo, E. U., Horwitz, B. A., and Herrera-Estrella, A. (2007) *Trichoderma atroviride* PHR1, a fungal photolyase responsible for DNA repair, autoregulates its own photoinduction. *Eukaryotic Cell*, 6(9), 1682-1692.
- Barrero, A. F., Sánchez, J. F., Oltra, J. E., Tamayo, N., Cerdá-Olmedo, E., Candau, R., Avalos, J. (1991) Fusarin C and 8Z-fusarin C from *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, 30(7), 2259-2263.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R.D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E.L., Studholme, D.J., Yeats, C., Eddy, S.R. (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 32 (Database issue): D138-D141.
- Bayram, O., Biesemann, C., Krappmann, S., Galland, P., Braus, G. H. (2008a) More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Molecular Biology of the Cell*, 19(8), 3254-3262.
- Bayram, Ö., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., ... & Braus, G. H. (2008). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*, 320(5882), 1504-1506.



- Bejarano, E. R., Avalos, J., Lipson, E. D., Cerdá-Olmedo, E. (1991) Photoinduced accumulation of carotene in *Phycomyces*. *Planta*, 183(1), 1-9.
- Beltrán-García, M. J., Ogura-Fujii, T., Manzo-Sánchez, G., & Arias-Castro, C. (2006). Catalasas de hongos fitopatógenos: Factores de virulencia y resistencia a fungicidas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 50-58.
- Berger, H., Pachlinger, R., Morozov, I., Goller, S., Narendja, F., Caddick, M., Strauss, J. (2006) The GATA factor AreA regulates localization and in vivo binding site occupancy of the nitrate activator NirA. *Molecular Microbiology*, 59(2), 433-446.
- Bernal-Bayard, J., Ramos-Morales, F. (2009) *Salmonella* type III secretion effector SlrP is an E3 ubiquitin ligase for mammalian thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), 27587-27595.
- Bernreiter, A., Ramon, A., Fernández-Martínez, J., Berger, H., Araujo-Bazan, L., Espeso, E. A., Pachlinger, R., Gallmetzer, A., Anderl, I., Scazzocchio, C. Strauss, J. (2007) Nuclear export of the transcription factor nira is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology*, 27(3), 791-802.
- Bieszke, J. A., Braun, E. L., Bean, L. E., Kang, S., Natvig, D.O., Borkovich, K. A. (1999) The nop-1 gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 8034-8039.
- Bieszke, J. A., Li, L., Borkovich, K. A. (2007) The fungal opsin gene nop-1 is negatively-regulated by a component of the blue light sensing pathway and influences conidiation-specific gene expression in *Neurospora crassa*. *Current Genetics*, 52(3-4), 149-157.
- Bindl, E., Lang, W., Rau, W. (1970) Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese. VI. Zeitlicher Verlauf der Synthese der einzelnen Carotinoide bei *Fusarium aquaeductuum* unter verschiedenen Induktionsbedingungen. *Planta*, 94(2), 156-174.
- Bluhm, B. H., Dunkle, L. D. (2008) PHL1 of *Cercospora zeae-maydis* encodes a member of the photolyase/cryptochrome family involved in UV protection and fungal development. *Fungal Genetics and Biology*, 45(10), 1364-1372.
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., Fischer, R. (2005) The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Current Biology*, 15(20), 1833-1838.
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N. ... & Plamann, M. (2004) Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(1), 1-108.
- Borthwick, H. A., Hendricks, S. B., Parker, M. W., Toole, E. H., Toole, V. K. (1952) A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 38(8), 662-666.
- Boyer, H. W., & Roulland-dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 41(3), 459-472.
- Bramley, P. M., Mackenzie, A. (1992) Carotenoid biosynthesis and its regulation in fungi. *Handbook of Applied Mycology*, 4, 401-444.

- Briggs, W. R. (2007) The LOV domain: a chromophore module servicing multiple photoreceptors. *Journal of Biomedical Science*, 14(4), 499-504.
- Britz, H., Coutinho, T. A., Wingfield, M. J., Marasas, W. F. O., Gordon, T. R., Leslie, J. F. (1999) *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* Represents a Distinct Mating Population in the *Gibberella fujikuroi* Species Complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1198-1201.
- Brown, B. O., Biesemann, C., Krappmann, S., Galland, P., Braus, G. H. (2008a) More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Molecular Biology of the Cell*, 19(8), 3254-3262.
- Brown, L. S. (2004) Fungal rhodopsins and opsin-related proteins: eukaryotic homologues of bacteriorhodopsin with unknown functions. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(6), 555-565.
- Bruchez, J. J. P., Eberle, J., Kohler, W., Kruft, V., Radford, A., & Russo, V. E. A. (1996). bli-4, a gene that is rapidly induced by blue light, encodes a novel mitochondrial, short-chain alcohol dehydrogenase-like protein in *Neurospora crassa*. *Molecular and General Genetics MGG*, 252(3), 223-229.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K. I., Ishiura, M., ... & Getzoff, E. D. (2003) Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Molecular Cell*, 11(1), 59-67.
- Burger, G., Strauss, J., Scazzocchio, C., Lang, B. F. (1991) nirA, the pathway-specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative GAL4- type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. *Molecular and Cellular Biology*, 11(11), 5746-5755.
- Burger, G., Tilburn, J., Scazzocchio, C. (1991) Molecular cloning and functional characterization of the pathway-specific regulatory gene NirA, which controls nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology*, 11(2), 795-802.
- Bussink, H.J., and Oliver, R. (2001) Identification of two highly divergent catalase genes in the fungal tomato pathogen, *Cladosporium fulvum*. *European Journal of Biochemistry*, 268(1), 15-24.
- Caddick, M. X., (2004) Nitrogen Regulation in Mycelial Fungi. *Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 349-368). Springer Berlin Heidelberg.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., and Keller, N. P. (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447-459.
- Candau, R., Avalos, J., Cerdá-Olmedo, E. (1991) Gibberellins and Carotenoids in the Wild Type and Mutants of *Gibberella Fujikuroi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3378-3382.
- Candau, R., Avalos, J., Cerdá-Olmedo, E. (1992) Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiology*, 100(3), 1184-1188.
- Carattoli, A., Romano, N., Ballario, P., Morelli, G., Macino, G. (1991) The *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (*albino-3*) reveals highly conserved regions among prenyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 266(9), 5854-5859.
- Casas-Flores, S., Ríos-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P., Herrera-Estrella, A. (2004) BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photocondiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* 150(11), 3561-3569.

- Casas-Flores, S., Ríos-Momberg, M., Rosales-Saavedra, T., Martínez-Hernández, P., Olmedo-Monfil, V., Herrera-Estrella, A. (2006) Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryotic Cell*, 5(3), 499-506.
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J., Liu, D. M. (1999) Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science*, 284(5415), 760-765.
- Castellanos, F., Schmoll, M., Martínez, P., Tisch, D., Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Esquivel-Naranjo, E. U. (2010) Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(5), 468-476.
- Castrillo, M., Avalos, J. (2014) Light-mediated participation of the VIVID-like protein of *Fusarium fujikuroi* VvdA in pigmentation and development. *Fungal Genetics and Biology*, 71, 9-20.
- Castrillo, M., Avalos, J. (2015). The flavoproteins CryD and VvdA cooperate with the white collar protein WcoA in the control of photocarotenogenesis in *Fusarium fujikuroi*. *PloS one*, 10(3)
- Castrillo, M., García-Martínez, J., Avalos, J. (2013) Light-dependent functions of the *Fusarium fujikuroi* CryD DASH cryptochrome in development and secondary metabolism. *Applied and environmental microbiology*, 79(8), 2777-2788.
- Cerdá-Olmedo, E. (1987) Carotene. In *Phycomyces*, edited by E. Cerdá-Olmedo and E. D. Lipson, 199–222. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cerdá-Olmedo, E. (2001) *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(5), 503-512.
- Chae, H. Z., Rhee, S.G. (1994) A thiol-specific antioxidant and sequence homology to various proteins of unknown function. *BioFactors* (Oxford, England), 4(3-4), 177-180.
- Chary, P., Natvig, D. O. (1989) Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects on oxidative stress, heat shock, and development. *Journal of bacteriology*, 171, 2646-2652
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L. O., Van der Horst, G. T., Batschauer, A., Ahmad, M. (2011) The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 335-364.
- Chen C. H., Dunlap J. C., Loros J. J. (2010) *Neurospora* illuminates fungal photoreception. *Fungal Genetics and Biology*, 47(11), 922-929.
- Chen, C. H., DeMay, B. S., Gladfelter, A. S., Dunlap, J. C., Loros, J. J. (2010) Physical interaction between VIVID and white collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), 16715-16720.
- Chen, G., Wang, C., Shi, T. (2011) Overview of available methods for diverse RNA-Seq data analyses. *Science China Life Sciences*, 54(12), 1121-1128.
- Cheng, P., Yang, Y., Gardner, K. H., Liu, Y. (2002) PAS domain-mediated WC-1/WC-2 interaction is essential for maintaining the steady-state level of WC-1 and the function of both proteins in circadian clock and light responses of *Neurospora*. *Molecular and Cellular Biology*, 22(2), 517-524.

- Cheng, P., He, Q., Yang, Y., Wang, L., Liu, Y. (2003a) Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), 5938-5943.
- Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., He, Q., Liu, Y. (2003b) WHITE COLLAR-1, a multifunctional neurospora protein involved in the circadian feedback loops, light sensing, and transcription repression of *wc-2*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 3801-3808.
- Chiang, T. Y., Marzluf, G. A. (1994) DNA recognition by the NIT2 nitrogen regulatory protein: importance of the number, spacing, and orientation of GATA core elements and their flanking sequences upon NIT2 binding. *Biochemistry*, 33(2), 576-582.
- Chiang, T. Y., Marzluf, G. A. (1995) Binding affinity and functional significance of NIT2 and NIT4 binding sites in the promoter of the highly regulated *nit-3* gene, which encodes nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Journal of bacteriology*, 177(21), 6093-6099.
- Core, L., Waterfall J., Lis J., (2008) Nascent RNA Sequencing Reveals Widespread Pausing and Divergent Initiation at Human Promoters. *Science*, 322(5909), 1845-1848.
- Correll J. C., (1987) Nitrate non utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology*, 77, 1640-1646.
- Corrochano, L. M. (2007) Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(7), 725-736.
- Corrochano, L. M., Avalos, J., (2010) Light Sensing. In *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, edited by K Borkovich, D Ebbole, and M Momany, 417-41. Washington: ASM press.
- Corrochano, L. M., Garre, V. (2010) Photobiology in the Zygomycota: multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genetics and Biology*, 47(11), 893-899.
- Crawford, N. M., Arst, H. N. (1993) The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annual Review of Genetics*, 27(1), 115-146.
- Crespo, J., Powers T., Fowler B., Hall, M. N. (2002) The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10), 6784-6789.
- Crosson, S., Moffat, K. (2002) Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch. *The Plant Cell*, 14(5), 1067-1075.
- Crosson, S., Rajagopal, S., Moffat, K. (2003) The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry*, 42(1), 2-10.
- Daines, B., Wang, H., Wang, L., Li, Y., Han, Y., Emmert, D., ... & Chen, R. (2011). The *Drosophila melanogaster* transcriptome by paired-end RNA sequencing. *Genome Research*, 21(2), 315-324.
- Daiyasu, H., Ishikawa, T., Kuma, K., Iwai, S., Todo, T., Toh, H. (2004) Identification of cryptochrome DASH from vertebrates. *Genes to Cells*, 9(5), 479-495.
- Davenport, K. R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D. E., & Gustin, M. C. (1995). A second osmosensing signal transduction pathway in yeast hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 270(50), 30157-30161.

- Davies, K. J. (1999) The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidase stress. *IUBMB life*, 48(1), 41-47.
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., & Klis, F. M. (2000) Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology*, 146(9), 2121-2132.
- De Virgilio, C. Loewith R., (2006) Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene*, 25(48), 6392-6415.
- Degli-Innocenti, F., Russo, V.E. (1984) Isolation of new white collar mutants of *Neurospora crassa* and studies on their behavior in the blue light-induced formation of protoperithecia. *Journal of Bacteriology*, 159(2), 757-761.
- Degnan, P. H., Ochman, H. (2012). Illumina-based analysis of microbial community diversity. *The ISME journal*, 6(1), 183-194.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., Toledano, M. B. (2002) Athiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*, 111(4), 471-481.
- Deponte, M. (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3217-3266.
- Desjardins, A. E., Proctor, R. H. (2007) Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International journal of food microbiology*, 119(1), 47-50.
- Di Masi, A., Trezza, V., Leboffe, L., Ascenzi, P. (2016) Human plasma lipocalins and serum albumin: Plasma alternative carriers? *Journal of Control Release* 228, 191-205.
- Díaz-Sánchez, V., Estrada, A. F., Trautmann, D., Al-Babili, S., Avalos, J. (2011) The gene *carD* encodes the aldehyde dehydrogenase responsible for neurosporaxanthin biosynthesis in *Fusarium fujikuroi*. *FEBS Journal*, 278(17), 3164-3176.
- Díaz-Sánchez, V., Avalos, J., Limón, M. C. (2012) Identification and regulation of *fusA*, the polyketide synthase gene responsible for fusarin production in *Fusarium fujikuroi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), 7258-7266.
- Dickman, M. B., Leslie J. F. (1992) The regulatory gene *nit-2* gene of *Neurospora crassa* complements a *nnu* mutant of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Molecular and General Genetics MGG*, 235(2-3), 458-462.
- Doke, N. (1997) The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Monograph Archive, 34, 785-813.
- Dubbs, J. M., & Mongkolsuk, S. (2007) Peroxiredoxins in bacterial antioxidant defense. In *Peroxiredoxin Systems* (pp. 143-193). Springer Netherlands.
- Ebel, J.P., Giegé, R., Bonnet, J., Kern, D., Befort, N., Bollack, C., Fasiolo, F., Gangloff, J. and Dirheimer, G. (1973) Factors determining the specificity of the tRNA aminoacylation reaction. *Biochimie*, 55, 547-557
- Edge, R., McGarvey, D. J., Truscott, T. G. (1997) The carotenoids as antioxidants. a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41(3), 189-200.
- Egan, A. N., Schlueter, J., & Spooner, D. M. (2012). Applications of next-generation sequencing in plant biology. *American journal of botany*, 99(2), 175-185.

- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J., Moras, D. (1990) Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, 347, 203–206.
- Estrada A. F., Avalos, J. (2009) Regulation and targeted mutation of *opsA*, coding for the NOP-1 opsin orthologue in *Fusarium fujikuroi*. *Journal of Molecular Biology*, 387(1), 59-73.
- Estrada, A. F., Avalos, J. (2008) The White Collar protein WcoA of *Fusarium fujikuroi* is not essential for photocarotenogenesis, but is involved in the regulation of secondary metabolism and conidiation. *Fungal Genetics and Biology*, 45(5), 705-718.
- Eyidogan, F., Öz, M. (2007) Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(5), 485-493.
- Fang, S., Lorick, K. L., Jensen, J. P., Weissman, A. M. (2003) RING finger ubiquitin protein ligases: implications for tumorigenesis, metastasis and for molecular targets in cancer. *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 13, No. 1, pp. 5-14). Academic Press.
- Fang, F. C. (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10), 820-832.
- Fernández-Martín, R., Cerdá-Olmedo, E., Avalos, J. (2000a) Homologous recombination and allele replacement in transformants of *Fusarium fujikuroi*. *Molecular and General Genetics MGG*, 263(5), 838-845.
- Fernández-Martín, R., Domenech, C., Cerdá-Olmedo, E., Avalos, J. (2000b) ent-Kaurene and squalene synthesis in *Fusarium fujikuroi* cell free extracts. *Phytochemistry*, 54(7), 723-728.
- Forde, B. G. (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1), 219-235.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17(7), 1866-1875.
- Freeman, B. A., Crapo, J. D. (1982) Free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 47(5), 412-426.
- Fridovich, I. (1974) Superoxide dismutases. In: *Advances in Enzymology* (Meister, A, ed.), 35-97. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA.
- Fridovich, I. (1998) The trail to superoxide dismutase. *Protein Science*, 7(12), 2688-2690.
- Froehlich, A. C., Chen, C. H., Belden, W. J., Madeti, C., Roenneberg, T., Mellow, M., Loros, J. J., Dunlap, J. C. (2010) Genetic and molecular characterization of a cryptochrome from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 9(5), 738-750.
- Froehlich, A. C., Noh, B., Vierstra, R. D., Loros, J.J., Dunlap J. C. (2005) Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 4(12), 2140-2152.
- Fu, Y. H., Marzluf, G. A. (1987) Characterization of *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, 7(5), 1691-1696.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., ... & Rehman, B. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422(6934), 859-868.
- Gamsjaeger, R., Liew, C. K., Loughlin, F. E., Crossley, M., Mackay, J. P. (2007) Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends in biochemical sciences*, 32(2), 63-70.

- Gan, Q., Chepelev, I., Wei, G., Tarayrah, L., Cui, K., Zhao, K., & Chen, X. (2010) Dynamic regulation of alternative splicing and chromatin structure in *Drosophila* gonads revealed by RNA-seq. *Cell Research*, 20(7), 763-783.
- Ganforina, M. D., Sánchez, D., Bastiani, M. J. (1995) Lazarillo, a new GPI-linked surface lipocalin, is restricted to a subset of neurons in the grasshopper embryo. *Development*, 121(1), 123-134.
- Gangloff, J., Ebel, J.P., Dirheimer, G. (1973) Isolation of a complex between yeast arginyl-tRNA synthetase and yeast tRNA<sup>Asp</sup> and mischarging of tRNA<sup>Asp</sup> with arginine. *International Research Communication System*, 12, 3-8.
- Gao, H., Wang, Y., Liu, X., Yan, T., Wo, L., Alm, E., Arkin, A., Thompson, D. K., Zhou, J. (2004) Global transcriptome analysis of the heat shock response of *Shewanella oneidensis*. *Journal of Bacteriology*, 186(22), 7796-7803.
- Garber, M., Grabherr, M., Guttman, M. C. T. (2011) Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature Methods*, 8(6):469-477
- García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Peña, J. M., Francois, J., ... & Arroyo, J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 15183-15195.
- García-Martínez, J., Brunk, M., Avalos, J., Terpitz, U. (2015) The CarO rhodopsin of the fungus *Fusarium fujikuroi* is a light-driven proton pump that retards spore germination. *Scientific Reports*, 5.
- Garg, N., Manchanda, G. (2009) ROS generation in plants: Boon or bane?. *Plant Biosystems*, 143(1), 81-96.
- Garre, V., Muller, U., Tudzynski, P. (1998) Cloning, characterization, and targeted disruption of *cpcat1*, coding for a planta secreted catalase of *Claviceps purpurea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(8), 772-783.
- Garre, V., Tenberge, K., Eising, R. (1998) Secretion of a fungal extracellular catalase by *Claviceps purpurea* during infection rye: Putative role in pathogenicity and suppression of host defence. *Phytopathology*, 88(8), 744-753.
- Georgiou, G., Masip, L. (2003) Biochemistry. An overoxidation journey with a return ticket. *Science*, 300(5619), 592.
- Ghugtyal, V., Vionnet, C., Roubaty, C., & Conzelmann, A. (2007). CWH43 is required for the introduction of ceramides into GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 65(6), 1493-1502.
- Giordano, W., Avalos, J., Cerdá-Olmedo, E., Domenech, C. E. (1999) Nitrogen availability and production of bikaverin and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiology letters*, 173(2), 389-393.
- Giovannucci, E. (2002). A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 227(10), 852-859.
- Goodwin, T. W. (1980) *The Biochemistry of the Carotenoids*, Ed 2, Vol 1. Chapman and Hall, London
- Gould, S. J., Keller, G. A., Hosken, N., Wilkinson, J., & Subramani, S. (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *The Journal of Cell Biology*, 108(5), 1657-1664.

- Guisbert, E., Herman, C., Lu, C. Z., Gross C. A. (2004) A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. *Genes & Development*, 18(22), 2812-2821.
- Gulledge, A. A., Roberts, A. D., Vora, H., Patel, K., Loraine, A. E. (2012) Mining *Arabidopsis thaliana* RNA-seq data with Integrated Genome Browser reveals stress-induced alternative splicing of the putative splicing regulator SR45a. *American Journal of Botany*, 99(2), 219-231.
- Guthrie, C., Fink, G. R. (1991) Getting started with yeast. *Methods in enzymology*, 194, 3-21.
- Häkkinen, M., Arvas, M., Oja, M., Aro, N., Penttilä, M., Saloheimo, M., Pakula, T. M. (2012) Re-annotation of the CAZy genes of *Trichoderma reesei* and transcription in the presence of lignocellulosic substrates. *Microbial cell factories*, 11(1), 1.
- Halliwell, B. (2000) The antioxidant paradox. *The Lancet* 2000; 355:1179-84.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557-580.
- Hansch, R., Fessel, D. G., Witt, C., Hesberg, C., Hoffmann, G., Walch-Liu, P., Engels, C., Kruse, J., Rennenberg, H., Kaiser, W. M., Mendel, R. R. (2001) Tobacco plants that lack expression of functional nitrate reductase in roots show changes in growth rates and metabolite accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 52(359), 1251-1258.
- Harding, R. W., & Melles, S. (1983) Genetic analysis of phototropism of *Neurospora crassa* perithecial beaks using white collar and albino mutants. *Plant Physiology*, 72(4), 996-1000.
- Harding, R. W., Turner, R. V. (1981) Photoregulation of the carotenoid biosynthetic pathway in albino and white collar mutants of *Neurospora crassa*. *Plant Physiology*, 68(3), 745-749.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., & Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75(4), 805-816.
- Hasan, S. A., Hayat, S., Ali, B., Ahmad, A. (2008) 28-Homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants. *Environmental Pollution*, 151(1), 60-66.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R. (2005) Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51-88.
- Heijne, W. H., Smith, D. W., Saier, M. H. Jr. (2001) Homologues of archaeal rhodopsins in plants, animals and fungi: structural and functional predications for a putative fungal chaperone protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1511(2), 206-223.
- Heintzen, C., Loros, J. J., Dunlap, J. C. (2001) The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. *Cell*, 104(3), 453-464.
- Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A. (2007) Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Molecular Microbiology*, 64(1), 5-15.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5), 462-468.
- Hoehn, P., Ariyurek, Y., Thygesen, H. H., Vreugdenhil, E., Vossen, R. H., de Menezes, R. X., ... & den Dunnen, J. T. (2008). Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms. *Nucleic acids research*, 36(21), e141-e141.



- Hofmann, B., Hecht, H. J., Flohe, L. (2002) Peroxiredoxins. *Biological Chemistry*, 383(3-4), 347-364.
- Hopwood, D. A. (1997) Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews*, 97(7), 2465-2498.
- Hori, S. (1898) Some observations on "bakanae" disease of the rice plant. *Mem. Agric. Res. Sta. Tokyo*, 12: 110-119.
- Hunt, S. M., Thompson, S., Elvin, M., Heintzen, C. (2010) VIVID interacts with the WHITE COLLAR complex and FREQUENCY-interacting RNA helicase to alter light and clock responses in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), 16709-16714.
- Idnurm, A., Heitman J. (2005a) Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biology*, 3(4), e95.
- Idnurm, A., Heitman, J. (2005b) Photosensing fungi: phytochrome in the spotlight. *Current Biology*, 15(20), R829-R832.
- Idnurm, A., Heitman, J. (2010) Ferrochelatase is a conserved downstream target of the blue light-sensing white collar complex in fungi. *Microbiology*, 156(8), 2393-2407.
- Idnurm, A., Rodríguez-Romero, J., Corrochano L. M., Sanz, C., Iturriaga, E. A., Eslava, A. P., Heitman, J. (2006) The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(12), 4546-4551.
- Idnurm, A., Howlett, B. J. (2001) Characterization of an opsin gene from the ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Genome*, 44(2), 167-171.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23-28.
- Jaimes-Arroyo, R., Lara-Rojas, F., Bayram, Ö., Valerius, O., Braus, G. H., & Aguirre, J. (2015) The *SrkA* Kinase Is Part of the *SakA* Mitogen-Activated Protein Kinase Interactome and Regulates Stress Responses and Development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 14(5), 495-510.
- Jones, D. S., Schofield, J. P. (1990) A rapid method for isolating high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. *Nucleic acids research*, 18(24), 7463.
- Jyonouchi, H., Zhang, L., Tomita, Y. (1993) Studies of immunomodulating actions of carotenoids. II. Astaxanthin enhances in vitro antibody production to T-dependent antigens without facilitating polyclonal B-cell activation. *Nutrition and Cancer*. 19: 269-80
- Kampinga, H. H., Brunsting, J. F., Stege, G. J., Burgman, P. W., Konings, A. W. (1995) Thermal protein denaturation and protein aggregation in cells made thermotolerant by various chemicals: role of heat shock proteins. *Experimental Cell Research*, 219(2), 536-546.
- Karniol, B., Wagner, J. R., Walker, J. M., Vierstra, R. D. (2005) Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochemical Journal*, 392(1), 103-116.
- Kennis, J. T., Van Stokkum, I. H., Crosson, S., Gauden, M., Moffat, K, Van Grondelle, R. (2004) The LOV2 domain of phototropin: a reversible photochromic switch. *Journal of the American Chemical Society*, 126(14), 4512-4513.

- Killeen, K. P., Nelson, D. R. (1988) Acceleration of starvation and glycerol-induced myxospore formation by prior heat shock in *Myxococcus xanthus*. *Journal of bacteriology*, 170(11), 5200-5207.
- Klein, R.M. (1992) Effects of green light on biological systems. *Biological Reviews*, 67(2), 199-284.
- Klittich, C. J. R., Leslie, J. F. (1988) Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics*, 118(3), 417-423.
- Kobayasi, M., Shoun, H. (1995) The copper-containing dissimilatory nitrite reductase involved in the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(8), 4146-4151.
- Koharyova, M., Kolarova, M. (2008) Oxidative stress and thioredoxin system. *General Physiology and Biophysics* 27(2): 71-84.
- Kohen, R., Nyske, A., (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and method for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650.
- Koob, G. F., LeMoal, M. D. M. (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 24(2), 97-129.
- Kozak, M. (1989) Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Molecular and Cellular Biology*, 9(11), 5073-5080.
- Kudla, B., Caddick, M. X., Langdon T., Martinez-Rossi, N. M., Bennett C. F., Sibley S., Davies R. W., Arst H. N. (1990) The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. . *The EMBO Journal*, 9(5), 1355.
- Kuhlman, E. G. (1983) Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium section Liseola*. *Mycologia*, 759-768.
- Kumagai, T. (1989). Temperature and mycochrome system in near-UV light inducible and blue light reversible photoinduction of conidiation in *Alternaria tomato*. *Photochemistry and photobiology*, 50(6), 793-798.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.
- Larkindale, J. Y., Knight, M. R. (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant physiology*, 128(2), 682-695.
- Lepoint, P.C.E., Munaut, F.T.J. and Maraite, H.M.M. (2005). *Gibberella xylarioides* sensu lato from *Coffea canephora*: A new mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8466-8471.
- Lee, K., Singh, P., Chung, W. C., Ash, J., Kim, T. S., Hang, L., Park, S. (2006) Light regulation of asexual development in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology*, 43(10), 694-706.
- Lee, R. B., Drew, M. C. (1989) Rapid, reversible inhibition of nitrate influx in barley by ammonium. *Journal of Experimental Botany*, 40(7), 741-752.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual* (Vol. 2, No. 10). Ames, IA, USA: Blackwell Pub..

- Levin, J. Z., Yassour, M., Adiconis, X., Nusbaum, C., Thompson, D. A., Friedman, N., Gnirke, A., Regev, A. (2010) Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods. *Nature Methods*, 7(9), 709-715.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79(4), 583-593.
- Liedvogel, M., Mouritsen, H. (2010) Cryptochromes-a potential magnetoreceptor: what do we know and what do we want to know? *Journal of the Royal Society Interface*, rsif20090411
- Limón, M. C., Rodríguez-Ortiz, R., Avalos, J. (2010). Bikaverin production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 21-29.
- Lin, C., Shalitin, D. (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 469-496.
- Lin, C, Todo, T. (2005) The cryptochromes. *Genome Biology*, 6(5), 220.
- Linden, H., Ballario, P., Macino, G. (1997) Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 22(3), 141-150.
- Linden, H., Macino, G. (1997) White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *The EMBO Journal*, 16(1), 98-109.
- Lindquist, S. (1986) The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry*, 55(1), 1151-1191.
- Lindquist, S. (1992) Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganism. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2(5), 748-755.
- Linnemannstöns, P., Schulte, J., Prado, M. M., Proctor, R. H., Avalos, J., Tudzynski, B. (2002a) The polyketide synthase gene *pks4* from *Gibberella fujikuroi* encodes a key enzyme in the biosynthesis of the red pigment bikaverin. *Fungal Genetics and Biology*, 37(2), 134-148.
- Linnemannstöns, P., Prado, M. M., Fernández-Martín, R., Tudzynski, B., Avalos, J. (2002b) A carotenoid biosynthesis gene cluster in *Fusarium fujikuroi*: the genes *carB* and *carRA*. *Molecular Genetics and Genomics*, 267(5), 593-602.
- Lipkowitz, S., Weissman, A. M. (2011) RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 11(9), 629-643.
- Lister, R., Gregory, B. D., Ecker, J. R. (2009) Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2), 107-118.
- Liu, T., Lu, B., Lee, I., Ondrovičová, G., Kutejová, E., Suzuki C. K. (2004) DNA and RNA binding by the mitochondrial lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 13902-13910.
- Liu, K. H., Tsay, Y. F. (2003) Switching between the two action modes of the dual affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO Journal*, 22(5), 1005-1013.
- Liu, J.H., Wang, W., Wu, H., Gong, X., Moriguchi, T. (2015) Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Frontiers in Plant Science*, 6, 827.
- Loewen, P. C. (1997) Bacterial catalases. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidants Defenses*. (Scandalios, JG, ed.), 273-308. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, New York, USA.

- López-Berges, M. S., Risipail, N., Prados-Rosales, R. C., Di Pietro, A. (2010) A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *The Plant Cell*, 22(7), 2459-2475.
- Lopez-Berges, M. S., Risipail, N., Prados-Rosales R. C. and Di Pietro, A. (2010) A nitrogen response pathway regulates virulence in plant pathogenic fungi: role of TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant Signaling & Behavior*, 5(12), 1623-1625.
- Lorca-Pascual, J. M., Murcia-Flores, L., Garre, V., Torres-Martínez, S., and Ruiz-Vázquez, R. M. (2004) The RING-finger domain of the fungal repressor *crgA* is essential for accurate light regulation of carotenogenesis. *Molecular Microbiology*, 52(5), 1463-1474
- Lu, B., Yadav, S., Shah, P. G., Liu, T., Tian, B., Puksza, S., Villaluna N., Kutejová, E., Newlon C. S., Santos J. H., Suzuki, C. K. (2007) Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17363-17374.
- Lucas-Lledó, J. I., Lynch, M. (2009) Evolution of mutation rates: phylogenomic analysis of the photolyase/cryptochrome family. *Molecular Biology and Evolution*, 26(5), 1143-1153.
- Lynch, M., Kuramitsu, H. (2000) Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, 2(10), 1245-1255.
- Macduff, J. H., Jackson, S. B.. (1992) Influx and efflux of nitrate and ammonium in italian ryegrass and white clover roots: comparisons between effects of darkness and defoliation. *Journal of Experimental Botany*, 43(4), 525-535.
- Macías-Seino, MN (2010) Relación de los carotenoides con el estrés oxidativo en *Fusarium fujikuroi*. Trabajo fin de Master
- Magasanik, B., Kaiser, C. A. (2002) Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290(1), 1-18.
- Maher, C. A., Kumar-Sinha, C., Cao, X., Kalyana-Sundaram, S., Han, B., Jing, X., Chinnaiyan, A. M. (2009) Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature*, 458(7234), 97-101.
- Maher, P., Davis, J.B. (1996) The Role of Monoamine Metabolism in Oxidative Glutamate Toxicity. *The Journal of Neuroscience*, 16(20), 6394-6401.
- Maiani G., Gaston M. J., Catasta, G., Toti, E., Cambrodon, I. G., Bysted, A., Granado-Lorenzo, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Bóhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnsnlian, D., Schlemmer, U. (2009) Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(S2), S194-S218.
- Malzahn, E., Ciprianidis, S., Káldi, K., Schafmeier, T., Brunner, M. (2010) Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains. *Cell*, 142(5), 762-772.
- Mares-Perlman, J. A., Millen, A. E., Ficek, T. L., Hankinson, S. E. (2002) The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 518S-524S.
- Margelis, S., Souza, C. D., Small, A. J., Hynes, M. J., Adams, T. H. and Davis, M. A. (2001) Role of glutamine synthetase in nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 183(20), 5826-5833.

- Marguerat, S., Bahler J. (2010) RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(4), 569-579.
- Marioni, J. C., Mason, C. E., Mane, S. M., Stephens, M. and Gilad, Y. (2008) RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research*, 18(9), 1509-1517.
- Martin-Yken, H., Dagkessamanskaia, A., De Groot, P., Ram, A., Klis, F., François, J. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* YCR017c/CWH43 encodes a putative sensor/transporter protein upstream of the BCK2 branch of the PKC1-dependent cell wall integrity pathway. *Yeast*, 18(9), 827-840.
- Marzluf, G. A. (1981) Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiological Reviews*, 45(3), 437.
- Marzluf, G. A. (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 17-32.
- Mathews, S., Sharrock, R. A. (1996) The phytochrome gene family in grasses (Poaceae): a phylogeny and evidence that grasses have a subset of the loci found in dicot angiosperms. *Molecular Biology and Evolution*, 13(8), 1141-1150.
- Matt, P., Geiger, M., Liu, W. P, Engels, C., Krapp, A., Stitt, M. (2001) Elevated carbon dioxide increases nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate. *Plant, Cell & Environment*, 24(11), 1119-1137.
- Matthews, J. M., Sunde, M. (2002) Zinc Fingers--Folds for Many Occasions. *IUBMB life*, 54(6), 351-355.
- McClure, R., Balasubramanian, D., Sun, Y., Bobrovskyy, M., Sumbly, P., Genco, C. A., ... & Tjaden, B. (2013). Computational Analysis of Bacterial RNA-Seq data. *Nucleic acids research*, 41(14), e140-e140.
- McLusky, S. R, Bennett, M. H, Beale, M. H., Lewis, M. J., Gaskin, P., Mansfield, J. W. (1999) Cell wall alteration and localised accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidases activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal*, 17(5), 523-534.
- Medentsev, A. G., Arinbasarova, A. Y., & Akimenko, V. K. (2001). Adaptation of the Phytopathogenic Fungus *Fusarium decemcellulare*, *Microbiology* 34-38.
- Merika, M., Orkin, S. H. (1993) DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Molecular and Cellular Biology*, 13(7), 3999-4010.
- Merrow, M., Franchi, L., Dragovic, Z., Görl, M., Johnson, J., Brunner, M., Macino, G., Roenneberg, T. (2001) Circadian regulation of the light input pathway in *Neurospora crassa*. *The EMBO Journal*, 20(3), 307-315.
- Metzker, M. L. (2010) Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31-46.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Breusegem, F. V., Noctor, G., (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4197-4220.

- Michán, S., Lledías, F., Hansberg, W. (2003) Asexual development is increased in *Neurospora crassa* cat-3-null mutant strains. *Eukaryotic Cell* 2, 798-808
- Michielse, C. B., Hooykaas, P. J., Van den Hondel, C. A., Ram, A. F. (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*, 48(1), 1-17.
- Mihlan, M., Homann, V., Liu, T. W. D., & Tudzynski, B. (2003) AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Molecular Microbiology*, 47(4), 975-991.
- Minowada, G., Welch, W. J. (1995) Clinical implications of the stress response. *Journal of Clinical Investigation*, 95(1), 3.
- Mishra, R. K., Singhal, G. S. (1992) Function of photosynthetic Apparatus of Intact Wheat Leaves under High Light and Heat Stress and Its Relationship with Peroxidation of Thylakoid Lipids. *Plant Physiology*, 98(1), 1-6.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004) The reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-498.
- Mooney, J. L., Yager, L. N. (1990a) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes & Development*, 4(9), 1473-1482.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods*, 5(7), 621-628.
- Müller, M., Carell, T. (2009) Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(3), 277-285.
- Murcia-Flores, L., Lorca-Pascual, J. M., Garre, V., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. M. (2007) Non-AUG translation initiation of a fungal RING finger repressor involved in photocarotenogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15394-15403
- Murshudov, G. N., Grebenko, A. I., Brannigan, J. A., Anston, A. A., Barynin, V. V., Dodson, G. G., Dauter, Z., Wilson, K. S., and Melik-Adamyany W. R. (2002) The structures of *Micrococcus lysodeikticus* catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(12), 1972-1982.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., Snyder, M. (2008) The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*, 320(5881), 1344-1349.
- Nathues, E., Joshi, S., Tenberge, K. B., Von den Driesch, M., Oeser, B., Baumer, N., Mihlan, M., Tudzynski, P. (2004) CPTF1, a CREB-like transcription factor, is involved in the oxidative stress response in the phytopathogen *Claviceps purpurea* and modulates ROS level in its host *Secale cereale*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(4), 383-393.
- Navarro, E., Sandmann, G., Torres-Martínez, S. (1995) Mutants of the carotenoid biosynthetic pathway of *Mucor circinelloides*. *Experimental Mycology*, 19(3), 186-190.
- Navarro, E., Peñaranda, A., Hansberg, W., Torres-Martínez, S., & Garre, V. (2013). A white collar 1-like protein mediates opposite regulatory functions in *Mucor circinelloides*. *Fungal Genetics and Biology*, 52, 42-52.
- Navarro, E., Lorca-Pascual, J., Quiles-Rosillo, M., Nicolás, F., Garre, V., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. (2001) A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Molecular Genetics and Genomics*, 266(3), 463-470.

- Navarro, E., Ruiz-Pérez, V. L., Torres-Martínez, S. (2000) Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*. *European Journal of Biochemistry*, 267(3), 800-807.
- Neubauer, H., Pantel, I., Lindgren, P. E., Goetz, F. (1999) Characterization of the molybdate transport system ModABC of *Staphylococcus carnosus*. *Archives of Microbiology*, 172(2), 109-115.
- Nicolas, F. E., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez R. M. (2003) Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *The EMBO Journal*, 22(15), 3983-3991.
- Nicolás, F. E., de Haro, J. P., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2007) Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genetics and Biology*, 44(6), 504-516.
- Niehaus, E. M., Kleigrewe, K., Wiemann, P., Studt, L., Sieber, C. M., Connolly, L. R., Freitag, M., Güldener, U., Tudzynski, B., Humpf, H. U. (2013) Genetic manipulation of the *Fusarium fujikuroi* fusarin gene cluster yields insight into the complex regulation and fusarin biosynthetic pathway. *Chemistry & Biology*, 20(8), 1055-1066.
- Nover, L., & Hellmund, D. (1984) Heat shock response of eukaryotic cells. Springer-Verlag.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H. I. (1998) Molecular systematics and phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* complex. *Mycologia*, 465-493.
- Oakley, A. J. (2005) Glutathione transferases: new functions. *Current opinion in Structural Biology*, 15(6), 716-723.
- Olajuyigbe, F. M., Nlekerem, C. M., Ogunyewo, O. A. (2016) Production and Characterization of Highly Thermostable  $\beta$ -Glucosidase during the Biodegradation of Methyl Cellulose by *Fusarium oxysporum*. *Biochemistry Research International*, 2016.
- Olmedo, M., Ruger-Herreros, C., Luque, E. M., Corrochano, L. M. (2010a) A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes con-10 and con-6 in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(4), 352-363.
- Olmedo, M., Ruger-Herreros, C., Corrochano, L. M. (2010b) Regulation by blue light of the fluffy gene encoding a major regulator of conidiation in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 184(3), 651-658.
- Ozsolak, F., Milos, P. M. (2011) RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature reviews genetics*, 12(2), 87-98.
- Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I. del Rio, L. A. (2002) Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6), 521-530.
- Pearson, W. R. (2005). Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods in Enzymology*, 401, 186-204.
- Peng, Z., Cheng, Y., Tan, B. C. M., Kang, L., Tian, Z., Zhu, Y., ... & Guo, J. (2012). Comprehensive analysis of RNA-Seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome. *Nature biotechnology*, 30(3), 253-260.
- Phan, H. T., Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Liew, E. C., Smith-White, J. L., & Clarkson, J. R. (2004). *Gibberella gaditjirrii* (*Fusarium gaditjirrii*) sp. nov., a new species from tropical grasses in Australia. *Studies in Mycology*, 50, 261-272.

- Pickrell, J. K., Marioni, J. C., Pai, A. A., Degner, J. F., Engelhardt, B. E., Nkadori, E., ... & Pritchard, J. K. (2010) Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing. *Nature*, 464(7289), 768-772.
- Pirkkala, L., Nykänen, P., & Sistonen, L. E. A. (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *The FASEB Journal*, 15(7), 1118-1131.
- Pokorny, R., Klar, T., Hennecke, U., Carell, T., Batschauer, A., Essen, L. O. (2008) Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 21023-21027.
- Pomar, F., Caballero, N., Pedreo, M. A., Ros-Barceló, A. (2002) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis. *FEBS Letters*, 529(2-3), 198-202.
- Ponts, N., Yang, J., Chung, D-W. D., Prudhomme, J., Girke, T., et al. (2008) Deciphering the Ubiquitin-Mediated Pathway in Apicomplexan Parasites: A Potential Strategy to Interfere with Parasite Virulence. *PloS One*, 3(6), e2386.
- Powis, G., Montfort, W. R. (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 30(1), 421-455.
- Prado, M. M., Prado-Cabrero, A., Fernández-Martín, R., Avalos, J. (2004) A gene of the opsin family in the carotenoid gene cluster of *Fusarium fujikuroi*. *Current Genetics*, 46(1), 47-58.
- Prado-Cabrero, A., Estrada, A. F., Al-Babili, S., Avalos, J. (2007b) Identification and biochemical characterization of a novel carotenoid oxygenase: elucidation of the cleavage step in the *Fusarium* carotenoid pathway. *Molecular Microbiology*, 64(2), 448-460.
- Prado-Cabrero, A., Schaub, P., Díaz-Sánchez, V., Estrada, A. F., Al-Babili, S., Avalos, J. (2009) Deviation of the neurosporaxanthin pathway towards beta-carotene biosynthesis in *Fusarium fujikuroi* by a point mutation in the phytoene desaturase gene. *FEBS Journal*, 276(16), 4582-4597.
- Prado-Cabrero, A., Scherzinger, D., Avalos, J., Al-Babili, S. (2007a) Retinal biosynthesis in fungi: Characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryotic Cell*, 6(4), 650-657.
- Pryor, W. A. (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, life times, and reactions. *Annual Review of Physiology*, 48(1), 657-667.
- Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., Fischer, R., (2006) Seeing the rainbow: Light sensing in fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 9(6), 566-571.
- Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., Schöser, M., Haas, H., Espeso E. A., Atoui, A., Calvo, A. M., Fischer, R. (2008) Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Current Biology*, 18(4), 255-259.
- Quiles-Rosillo, M. D., Ruiz-Vázquez, R. M., Torres-Martínez, S., Garre, V. (2005) Light induction of the carotenoid biosynthesis pathway in *Blakeslea trispora*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(2), 141-153.
- Quiles-Rosillo, M. D., Torres-Martínez, S., Garre, V. (2003) *cigA* a light-inducible gene involved in vegetative growth in *Mucor circinelloides* is regulated by the carotenogenic repressor *crgA*. *Fungal Genetics and Biology*, 38(1):122-132, Feb



- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M. A., Barceló, A., Amaya, I., Medina, M. I., Alonso, F. J., De Forchetti, S. M., Tigier, H., Valpuesta, V. (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology*, 122(4), 1119-1128.
- Rademacher, W. (1992) Occurrence of gibberellins in different species of the fungal Order *Ortigena* *Sphaceloma* and *Elsinoe*. *Phytochemistry*, 31(12), 4155-4157.
- Ram, A. F., Wolters, A., Hoopen, R. T., & Klis, F. M. (1994). A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast*, 10(8), 1019-1030.
- Ram, A. F. J., Brekelmans, S. S. C., Oehlen, L. J. W. M., & Klis, F. M. (1995). Identification of two cell cycle regulated genes affecting the  $\beta$ 1, 3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 358(2), 165-170.
- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. (1994) Families of cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*, 244, 19.
- Richardson, D. J., and Watmough, N. J. (1999) Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(2), 207-219.
- Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular cell*, 40(2), 253-266.
- Río-Olagüe, F., Alanís, G. M., Candelas-Cadillo, M. G. (2006) Cuantificación de licopeno y otros carotenoides en tomate y polvo de tomate. *Revista Mexicana de Agronegocios*
- Robbertse, B., Yoder, O. C., Nguye, A., Schoch, C. L., and Turgeon, B. G. (2003) Deletion of all *Cochliobolus heterostrophus* monofunctional catalase-encoding genes reveals a role for one in sensitivity to oxidative stress but none with a role in virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(11), 1013-1021.
- Rockwell, N. C., Su, Y. S., Lagarias, J. C (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 837.
- Rodríguez-Ortiz, R. (2012) Análisis genético y molecular del fenotipo *carS* en *Fusarium*. (Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla).
- Rodríguez-Ortiz, R., Limón, M. C., Avalos, J. (2009) Regulation of carotenogenesis and secondary metabolism by nitrogen in wild-type *Fusarium fujikuroi* and carotenoid-overproducing mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), 405-413.
- Rodríguez-Ortiz, R., Limón, M. C., Avalos, J. (2013) Functional analysis of the *carS* gene of *Fusarium fujikuroi*. *Molecular Genetics and Genomics*, 288(3-4), 157-173.
- Rodríguez-Ortiz, R., Mehta, B. J., Avalos, J., Limón, M. C. (2010) Stimulation of bikaverin production by sucrose and by salt starvation in *Fusarium fujikuroi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1991-2000.
- Rodríguez-Ortiz, R., Michielse, C., Rep, M., Limón, M. C., and Avalos, J. (2012) Genetic basis of carotenoid overproduction in *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*, 49(9), 684-696.
- Rodríguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Müller, S., Fischer, R. (2010) Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Microbiology*, 64(1), 585.
- Rodríguez-Sáiz, M., Paz, B., de la Fuente, J. L., López-Nieto, M. J., Cabri, W., Barredo, J. L. (2004) *Blakeslea trispora* Genes for Carotene Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5589-5594.

- Rohde, J. R., Bastidas, R., Puria, R., Cardenas, M. E. (2008) Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), 153-160.
- Romero-Campero, F. J., Lucas-Reina, E., Said, F. E, Romero, J. M., Valverde, F. (2013) A contribution to the study of plant development evolution based on gene co-expression networks. *Frontiers in Plant Science*, 4, 291-291.
- Ros-Barceló, A., Pomar, F., López-Serrano, M., Pedreño, M. A. (2003) Peroxidase: A multifunctional enzyme in grapevines. *Functional Plant Biology*, 30(6), 577-591.
- Rosales-Saavedra, T., Esquivel-Naranjo, E. U., Casas-Flores, S., Martínez-Hernández, P., Ibarra-Laclette, E., Cortes-Penagos, C., Herrera-Estrella, A. (2006) Novel light- regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology*, 152(11), 3305-3317.
- Rotanova, T. V., Melnikov, E. E., Khalatova, A. G., Makhovskaya, O. V., Botos, I., Wlodawer, A., Gustchina, A. (2004) Classification of ATP-dependent proteases Lon and comparison of the active sites of their proteolytic domains. *European Journal of Biochemistry*, 271(23-24), 4865-4871.
- Rouhier, N., Koh, C. S., Gelhaye, E., Corbier, C., Favier, F., Didierjean, C., Jacquot, J. P. (2008) Redox based anti-oxidant systems in plants: biochemical and structural analyses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(11), 1249-1260.
- Ruger-Herreros, C., Rodríguez-Romero, J., Fernández-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L. M., Cánovas, D. (2011) Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 188(4), 809-822.
- Ruiz-González, M. X., Marín, I. (2004) New insights into the evolutionary history of type 1 rhodopsins. *Journal of Molecular Evolution*, 58(3), 348-358.
- Ruiz-Hidalgo, M. J., Benito, E. P., Sandmann, G., Eslava, A. P. (1997) The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Molecular and General Genetics MGG*, 253(6), 734-744.
- Ruiz-Roldán, M. C., Garre, V., Guarro, J., Mariné, M., Roncero, M. I. G. (2008) Role of the white collar 1 photoreceptor in carotenogenesis, UV resistance, hydrophobicity, and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell*, 7(7), 1227-1230.
- Rustici, G., van Bakel, H., Lackner, D. H., Holstege, F. C., Wijmenga, C., Bähler, J., & Brazma, A. (2007). Global transcriptional responses of fission and budding yeast to changes in copper and iron levels: a comparative study. *Genome Biology*, 8(5), R73.
- Sahnoun, Z., Jamoussie, K., Zegal, K. M. (1997) Free radicals and antioxidants: human physiology and therapeutic aspects. *Therapie*, 52(4), 251-270.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T. E., Christie, J. M., Briggs, W. R., Wada, M., Okada, K. (2001) *Arabidopsis* nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6969-6974.
- Salier, J. P., Åkerström, B., Borregaard, N., Flower, D. R. (2004) Lipocalins in bioscience: the first family gathering. *Bioessays*, 26(4), 456-458.
- Sambrook J., Russell D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. (3rd ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, NY (EEUU).

- Sancar, A. (2004). Photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Advances in Protein Chemistry*, 69, 73.
- Sánchez-Fernández, R., Avalos, J., Cerdá-Olmedo, E. (1997) Inhibition of gibberellin biosynthesis by nitrate in *Gibberella fujikuroi*. *FEBS Letters*, 413(1), 35-39.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gómez, M., Romero-Puertas, M. C., del Rio, L. A. (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(364), 2115-2126.
- Sandmann, G., & Misawa, N. (2002). Fungal carotenoids. In *Industrial Applications* (pp. 247-262). Springer Berlin Heidelberg.
- Sano, H., Kaneko, S., Sakamoto, Y., Sato, T., Shishido, K. (2009) The basidiomycetous mushroom *Lentinula edodes* white collar-2 homolog PHRB, a partner of putative blue-light photoreceptor PHRA, binds to a specific site in the promoter region of the *L. edodes* tyrosinase gene. *Fungal Genetics and Biology*, 46(4), 333-341.
- Sano, H., Narikiyo, T., Kaneko, S., Yamazaki, T., Shishido, K. (2007) Sequence analysis and expression of a blue-light photoreceptor gene, *Le.phrA* from the basidiomycetous mushroom *Lentinula edodes*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(9), 2206-2213.
- Sanz, C., Rodríguez-Romero, J., Idnurm, A., Christie, J. M., Heitman, J., Corrochano, L. M., Eslava, A. P. (2009) *Phycomyces* MADB interacts with MADA to form the primary photoreceptor complex for fungal phototropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(17), 7095-7100.
- Saranak, J., Foster, K. W. (1997) Rhodopsin guides fungal phototaxis. *Nature*, 387(6632), 465-466.
- Sargent, M. L., & Briggs, W. R. (1967). The effects of light on a circadian rhythm of conidiation in *Neurospora*. *Plant Physiology*, 42(11), 1504-1510.
- Schafmeier, T., Haase, A., Kaldi, K., Scholz, J., Fuchs, M., Brunner, M. (2005) Transcriptional feedback of *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell*, 122(2), 235-246.
- Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., Marsden, C. D. (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 54(3), 823-827.
- Scharff, A. M., Egsgaard, H., Hansen, P. E., Rosendahl, L. (2003) Exploring symbiotic nitrogen fixation and assimilation in pea root nodules by in vivo <sup>15</sup>N Nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiology*, 131(1), 367-378.
- Schenk, P. M., Carvalhais, L. C., Kazan, K. (2012). Unraveling plant-microbe interactions: can multi-species transcriptomics help?. *Trends in biotechnology*, 30(3), 177-184.
- Schmidhauser, T. J., Lauter, F. R., Russo, V. E., Yanofsky, C. (1990) Cloning, sequence, and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, 10(10), 5064-5070
- Schmidhauser, T. J., Lauter, F. R., Schumacher, M., Zhou, W., Russo, V. E., & Yanofsky, C. (1994). Characterization of *al-2*, the phytoene synthase gene of *Neurospora crassa*. Cloning, sequence analysis, and photoregulation. *Journal of Biological Chemistry*, 269(16), 12060-12066.

- Schmoll, M., Franchi, L., Kubicek, C. P., (2005) Envoy, a PAS/LOV domain protein of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*), modulates cellulase gene transcription in response to light. *Eukaryotic Cell*, 4(12), 1998-2007.
- Schmoll, M., Zeilinger, S., Mach, R. L., Kubicek, C. P. (2004) Cloning of genes expressed early during cellulase induction in *Hypocrea jecorina* by a rapid subtraction hybridization approach. *Fungal Genetics and Biology*, 41(9), 877-887.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., ... & Ragg, T. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7(1), 3.
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., Bennink, J. R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404(6779), 770-774.
- Schure, E. G., Riel, N. A. W., Verrips, C. T. (2000) The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 67-83.
- Schwerdtfeger, C., Linden, H. (2001) Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 39(4), 1080-1087.
- Schwerdtfeger, C., Linden, H. (2003) VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *The EMBO Journal*, 22(18), 4846-4855.
- Selby, C. P., Sancar, A. (2006) A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47), 17696-17700.
- Serrano, R., Martín, H., Casamayor, A., & Ariño, J. (2006). Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAPK pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 39785-39795.
- Sharma, A. K., Spudich, J. L., Doolittle, W. F. (2006) Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. *Trends in Microbiology*, 14(11), 463-469.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360(1), 1-16.
- Shelest, E. (2008) Transcription factors in fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 286(2), 145-151.
- Silva, F., Navarro, E., Peñaranda, A., Murcia-Flores, L., Torres-Martínez, S., Garre, V. (2008) A RING-finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis-independent ubiquitylation of a white collar-1-like activator. *Molecular Microbiology*, 70(4), 1026-1036.
- Silva, F., Torres-Martínez, S., Garre, V. (2006) Distinct white collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Molecular Microbiology*, 61(4): 1023-1037
- Simova-Stoilova, L., Vaseva, I., Grigorova, B., Demirevska, K., Feller, U. (2010) Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(2), 200-206.
- Singh, S., Khan, N. A., Nazar, R., Anjum, N. A. (2008) Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) under cadmium stress. *American Journal of Plant Physiology* 3: 25-32.

- Singh, G., Verma, A. K., Kumar, V. (2015) Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of  $\beta$ -glucosidases. 3 Biotech, 6(1), 1-14.
- Siverio, J. M. (2002) Assimilation of nitrate by yeasts. FEMS Microbiology Reviews, 26(3), 277-284.
- Smirnoff, N. (2000) Ascorbic acid: Metabolism and functions of a multi-faceted molecule. Current Opinion in Plant Biology, 3(3), 229-235.
- Smith, H. (2000) Phytochromes and light signal perception by plants - an emerging synthesis. Nature, 407(6804), 585-591.
- Sottomayor, M., Ros Barceló, A. (2004) Plant peroxidases and phytochemistry. Phytochemical Review, 3, 1-256.
- Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. Journal of molecular biology, 189(1), 113-130.
- Sumii, M., Furutani, Y., Waschuk, S. A., Brown, L. S., Kandori, H. (2005) Strongly hydrogen-bonded water molecule present near the retinal chromophore of *Leptosphaeria rhodopsin*, the bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote. Biochemistry, 44(46):15159-15166
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. PloS one, 6(7), e21800.
- Surekha, C. H., Neelapu, N. R. R., Kamala, G., Prasad, B. S., Ganesh, P. S. (2013). Efficacy of *Trichoderma viride* to induce disease resistance and antioxidant responses in legume *Vigna Mungo* infested by *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. International Journal of Agricultural Science and Research, 3(2), 285-294.
- Swinkels, B. W., Gould, S. J., Bodnar, A. G., Rachubinski, R. A., & Subramani, S. (1991). A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. The EMBO Journal, 10(11), 3255.
- Tagua, V. G., Medina, H. R., Martín-Domínguez, R., Eslava, A. P., Corrochano, L. M., Cerdá-Olmedo, E., Idnurm, A. (2012) A Gene for Carotene Cleavage Required for Pheromone Biosynthesis and Carotene Regulation in the Fungus *Phycomyces Blakesleeanus*. Fungal Genetics and Biology, 49(5), 398-404.
- Tagua, V. G., Pausch, M., Eckel, M., Gutierrez, G., Miralles-Durán, A., Sanz, C., Eslava, A. P., Pokorný, R., Corrochano, L. M., Batschauer, A. (2015) Fungal cryptochrome with DNA repair activity reveals an early stage in cryptochrome evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(49), 15130-15135.
- Takaya, N. (2002) Dissimilatory nitrate reduction metabolism and their control in fungi. Journal of Bioscience and Bioengineering, 94(6), 506-510.
- Taylor, B. L., Zhulin, I. B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63(2), 479-506.
- Teichert, S., Rutherford, J. C., Wottawa, M., Heitman J., Tudzynski, B. (2008) Impact of ammonium permeases MepA, MepB, and MepC on nitrogen-regulated secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*. Eukaryotic Cell, 7(2), 187-201.
- Teichert, S., Schönig, B., Richter, S., Tudzynski, B. (2004) Deletion of the *Gibberella fujikuroi* glutamine synthetase gene has significant impact on transcriptional control of primary and secondary metabolism. Molecular Microbiology, 53(6), 1661-1675.

- Teichert, S., Wottawa, M., Schonig, B., Tudzynski, B. (2006) Role of the *Fusarium fujikuroi* TOR kinase in nitrogen regulation and secondary metabolism. *Eukaryotic Cell*, 5(10), 1807-1819.
- Terashima, K., Yuki, K., Muraguchi, H., Akiyama, M., Kamada, T. (2005) The *dst1* gene involved in mushroom photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* encodes a putative photoreceptor for blue light. *Genetics*, 171(1), 101-108.
- Thewes, S., Prado-Cabrero, A., Prado, M. M., Tudzynski, B., Avalos, J. (2005) Characterization of a gene in the car cluster of *Fusarium fujikuroi* that codes for a protein of the carotenoid oxygenase family. *Molecular Genetics and Genomics*, 274(3), 217-228.
- Topisirovic, I., Gutierrez, G. J., Chen, M., Appella, E., Borden, K. L. B., Ronai, Z. A. (2009) Control of p53 multimerization by Ubc13 is JNK-regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12676–12681.
- Torres, M. A., Dangl, J. L. (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 397-403.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., ... & Pachter, L. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3), 562–578.
- Tsay, Y. F., Chiu, C. C., Tsai, C. B., Ho, C. H., Hsu, P. K. (2007) Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters*, 581(12), 2290-2300.
- Tudzynski, B., Homann, V., Feng, B., Marzluf, G.A. (1999) Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*. *Molecular and General Genetics MGG*, 261(1), 106-114.
- Tudzynski, B. (2005) Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(6), 597-611.
- Tudzynski, B. (1999) Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(3), 298-310
- Tudzynski, B. (2014) Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Ukibe, K., Hashida, K., Yoshida, N., Takagi, H., (2009) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7205-7211.
- Umemura, M., Fujita, M., Yoko-o, T., Fukamizu, A., & Jigami, Y. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* CWH43 is involved in the remodeling of the lipid moiety of GPI anchors to ceramides. *Molecular biology of the cell*, 18(11), 4304-4316.
- Unkles, S. E., Rouch, D. A., Wang, Y., Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., Kinghorn, J. R. (2004) Two perfectly conserved arginine residues are required for substrate binding in a high-affinity nitrate transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(50), 17549-17554.
- Unkles, S. E., Wang, R., Wang, Y., Glass, A. D. M., Crawford, N. M., and Kinghorn, J. R. (2004) Nitrate reductase activity is required for nitrate uptake into fungal but not plant cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 28182-28186.
- Unterman, R. D., Lynch, K. R., Nakhasi, H. L., Dolan, K. P., Hamilton, J. W., Cohn, D. V., Feigelson,

- P. (1981) Cloning and sequence of several alpha 2u-globulin cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(6), 3478-3482.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohe, L. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymology*, 252, 38-53.
- Vacca, R. A., de Pino, M. C., Valenti, D., Passarella, S., Marra, E., De Gara, L., (2004) Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiology*, 134(3), 1100-1112
- Van der Horst, M. A., Hellingwerf, K. J. (2004) Photoreceptor proteins, 'star actors of modern times': a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Accounts of Chemical Research*, 37(1), 13-20.
- Van Verk, M.C., Hickman, R., Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M. (2013) RNA-Seq: revelation of the messengers. *Trends in Plant Science*, 18(4), 175-179.
- Velayos, A., Blasco, J. L., Alvarez, M. I., Iturriaga, E. A., Eslava, A. P. (2000a) Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. *Planta*, 210(6), 938-946.
- Velayos, A., Eslava, A. P., Iturriaga, E. A. (2000b) A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5509-5519.
- Velayos, A., López-Matas M. A., Ruiz-Hidalgo M. J., Eslava, A. P. (1997) Complementation analysis of carotenogenic mutants of *Mucor circinelloides*. *Fungal Genetics and Biology*, 22(1), 19-27.
- Veluchamy, S., Rollins, J. A. (2008) A CRY-DASH-type photolyase/ cryptochrome from *Sclerotinia sclerotiorum* mediates minor UV-A-specific effects on development. *Fungal Genetics and Biology*, 45(9), 1265-1276.
- Vierling, E. (1991) "The roles of heat shock proteins in plants" *Annual Review of Plant Biology*, 42(1), 579-620.
- Vilella, F., Herrero, E., Torres, J., & de la Torre-Ruiz, M. A. (2005). Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9149-9159.
- Wang, H., Cui, X., Gu, Q., Chen, Y., Zhou, J., Kuang, Y., ... & Xu, X. (2012). Retinol dehydrogenase 13 protects the mouse retina from acute light damage. *Molecular Vision* 18:1021-1030
- Wang, H. Y., Deng, X. W. (2002) *Arabidopsis* FHY3 defines a key phytochrome A signaling component directly interacting with its homologous partner FAR1. *The EMBO Journal*, 21(6), 1339-1349.
- Wang, N., Yoshida, Y., Hasunuma, K. (2007) Loss of Catalase-1 (Cat-1) results in decreased conidial viability enhanced by exposure to light in *Neurospora crassa*. *Molecular Genetics and Genomics* 277, 13-22.
- Wang, Y., Li, W., Siddiqi, Y., Kinghorn, J. R., Unkles, S. E., Glass, A. D. (2007) Evidence for post-translational regulation of NrtA, the *Aspergillus nidulans* high-affinity nitrate transporter. *New Phytologist*, 175(4), 699-706.

- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63.
- Wang, L., Feng, Z., Wang, X., Wang, X., Zhang, X. (2010) DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, 26(1), 136-138.
- Ward J., Ponnala, L., Weber, C. (2012) Strategies for Transcriptome Analysis in Nonmodel Plants. *American Journal of Botany* 99 (2): 267-276, EE.UU.
- Wiemann, P., Willmann, A., Straeten, M., Kleigrew, K., Beyer, M., Humpf, H. U., Tudzynski, B. (2009) Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Molecular Microbiology*, 72(4), 931-946.
- Wiemann, P., Sieber, C. M. K., Von Bargen K. W., Studt, L., Niehaus, E. M., Espino, J. J., ... & Bergner, S. V. (2013) Deciphering the Cryptic Genome: Genome-wide Analyses of the Rice Pathogen *Fusarium fujikuroi* Reveal Complex Regulation of Secondary Metabolism and Novel Metabolites. *PLoS Pathogens*, 9(6), e1003475.
- Waschuk, S. A., Bezerra, A. G., Shi, L. Brown, L. S. (2005) *Leptosphaeria rhodopsin*: bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(19), 6879-6883.
- Wong, K. H., Hynes M. J., Davis, M. A. (2008) Recent advances in nitrogen regulation: a comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. *Eukaryotic Cell*, 7(6), 917-925.
- Wood, Z. A., Shoroeder, E., Harris, J. R., Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(1), 32-40.
- Worthington, E. N., Kavakli, I. H., Berrocal-Tito, G., Bondo, B. E., Sancar, A. (2003) Purification and characterization of three members of the photolyase/ cryptochrome family blue-light photoreceptors from *Vibrio cholerae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 39143-39154.
- Wu, C., Yang, F., Smith, K.M., Peterson, M., Dekhang, R., Zhang, Y., Zucker, J., Bredeweg, E.L., Mallappa, C., Zhou, X., Lyubetskaya, A., Townsend, J.P., Galagan, J.E., Freitag, M., Dunlap, J.C., Bell-Pedersen, D., Sachs, M.S., (2014). Genome-wide characterization of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *G3 (Bethesda)*. 4, 1731-1745.
- Wullschlegel, S., Loewith R., Hall, M. N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), 471-484.
- Yamaguchi, S. (2007). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 225-251.
- Yoshida, Y., Hasunuma, K. (2004) Reactive oxygen species affect photomorphogenesis in *Neurospora crassa*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6986-6993.
- Yuan, G. F., Fu, Y. H., Marzluf, G. A. (1991) nit-4, a pathway-specific regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative binuclear zinc DNA-binding domain. *Molecular and Cellular Biology*, 11(11), 5735-5745
- Zeller, K. A., Bowden, R. L., & Leslie, J. F. (2004). Population differentiation and recombination in wheat scab populations of *Gibberella zeae* from the United States. *Molecular Ecology*, 13(3), 563-571.
- Zhai, Y., Heijne, W. H., Smith, D. W., & Saier, M. H. (2001). Homologues of archaeal rhodopsins in plants, animals and fungi: structural and functional predications for a putative fungal



- chaperone protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1511(2), 206-223.
- Zhao, S., Fung-Leung, W. P., Bittner, A., Ngo, K., Liu, X. (2014) Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells. *PloS one*, 9(1), e78644.
- Zhou, Q., Su, X., Wang, A., Xu, J., Ning, K. (2013) QC-Chain: fast and holistic quality control method for next-generation sequencing data. *PLoS One*, 8(4), e60234.
- Zoltowski, B. D., Schwerdtfeger, C., Widom, J., Loros, J. J., Bilwes, A.M., Dunlap, J.C., Crane, B.R. (2007) Conformational switching in the fungal light sensor Vivid. *Science*, 316(5827), 1054-1057.
- Zoltowski, B. D., Crane, B. R. (2008) Light activation of the LOV protein vivid generates a rapidly exchanging dimer. *Biochemistry*, 47(27), 7012-7019.



## **X. ANEXOS**



## X. Anexo 1.A Genes activados por luz en la estirpe silvestre

FFUJ_05633	Inf	
FFUJ_12435	626.056911231992	
FFUJ_09119	452.542663943565	NAD_binding_8 Pyr_redox DUF3452
FFUJ_08272	353.971648137569	DUF3140 KIND
FFUJ_11804	296.839649822333	Bac_rhodopsin
FFUJ_09320	291.390493381271	Ferritin_2
FFUJ_03418	255.156750437234	CHZ
FFUJ_01292	208.152921913943	
FFUJ_02302	205.703139125164	DHQ_synthase
FFUJ_10895	182.550270966787	
FFUJ_02301	128.165130905695	Alba Vps16_C ATP-grasp_4
FFUJ_10896	124.543852370091	
FFUJ_13896	119.108288447103	Fasciclin Fasciclin Fasciclin Fasciclin
FFUJ_10321	107.500532802163	
FFUJ_05402	102.969267459381	
FFUJ_11801	96.6601949923004	RPE65 PPI_Ypi1
FFUJ_06055	87.484771297747	
FFUJ_09337	83.3470943685471	
FFUJ_05128	79.1254557968648	Catalase Catalase-rel Catalase Catalase-rel
FFUJ_11803	78.2874962710664	Amino_oxidase Amino_oxidase
FFUJ_11802	70.4945587661	SQS_PSY
FFUJ_06628	61.0263330817033	
FFUJ_05732	57.4012400920673	
FFUJ_01993	55.7457475722344	
FFUJ_11472	54.772886254505	Oxidored_molyb SLBB Mo-co_dimer Catalase Catalase-rel
FFUJ_09007	48.2788698624453	ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_01088	45.587298101233	
FFUJ_03586	45.3921211147442	DUF150 YPEB DUF1409
FFUJ_11713	43.3412843222286	PAS_9
FFUJ_05082	41.6550643070998	
FFUJ_09378	40.0969334290604	DUF1772
FFUJ_10505	35.4351683970763	
FFUJ_00436	35.1328814492342	DNA_photolyase Usp FAD_binding_7 DNA_photolyase Usp FAD_binding_7
FFUJ_10692	34.817965497753	
FFUJ_10705	34.7088100541033	
FFUJ_00337	33.8670401220492	Methyltransf_24 Methyltransf_24
FFUJ_10466	33.7077867943188	
FFUJ_09120	33.2898392754862	Sugar_tr
FFUJ_10367	33.0211852586764	
FFUJ_08014	32.8504220326231	ADH_N ADH_zinc_N ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_05524	32.5406237445091	
FFUJ_07351	30.3213062200675	MFS_1 MFS_1 OAD_gamma MFS_1 MFS_1 OAD_gamma
FFUJ_11615	29.891636947939	
FFUJ_05585	29.6115889066358	
FFUJ_11877	29.4362094502928	F-box-like
FFUJ_01785	29.396856781269	
FFUJ_05934	29.1660882474968	
FFUJ_03408	28.6326639867103	Abhydrolase_5
FFUJ_04335	28.4984193884402	
FFUJ_06163	27.6788097476938	
FFUJ_04061	27.3682256666621	FAD_binding_3 FAD_binding_3
FFUJ_14546	24.6350415530646	GFA
FFUJ_00295	24.5961396830662	KGG KGG KGG KGG KGG KGG
FFUJ_09358	23.9514318541755	Sterol-sensing Amidase Orn_DAP_Arg_deC Amidase
FFUJ_11542	22.1566828221615	Metallophos
FFUJ_07515	22.1497728708776	SIS SIS
FFUJ_05515	21.2600045423737	
FFUJ_06304	20.4371199882827	
FFUJ_09310	19.7343897213287	NmrA

FFUJ_04654	19.2499127271614	FAD_binding_3 FAD_binding_3
FFUJ_13569	17.5036027977378	Peptidase_S8 fn3_5 FlgD_ig
FFUJ_11751	16.6296972622587	DUF3237
FFUJ_10836	13.0878843492614	
FFUJ_04508	13.0375420430781	DNA_pol3_alpha Pyrid_ox_like DNA_pol3_alpha Pyrid_ox_like
FFUJ_05766	12.8741921363256	
FFUJ_00034	12.6090702933092	
FFUJ_06988	12.3973511630214	Aldo_ket_red Aldo_ket_red
FFUJ_06207	11.8225554237032	
FFUJ_06907	11.8034770176427	AP_endonuc_2 AP_endonuc_2
FFUJ_07962	11.7649232184213	RPE65 RPE65
FFUJ_00275	11.6836569576072	GFA GFA
FFUJ_11222	11.445352568642	Glycos_transf_1
FFUJ_01396	11.3423682759214	
FFUJ_13152	11.1646800280065	L-fibroin DUF1074 Phasin_2 Apolipoprotein
FFUJ_14904	11.1017099433268	Arylesterase
FFUJ_13751	11.0531831595909	DUF4692 SR-25
FFUJ_11042	10.8933818265736	
FFUJ_11562	10.8804777496685	His_Phos_2
FFUJ_11003	10.6859998728913	
FFUJ_01887	10.5909492758164	
FFUJ_04580	10.112936014468	CFEM CFEM DUF4366 TMEM51 DUF1191 CFEM CFEM DUF4366 TMEM51 DUF1191
FFUJ_06758	10.0494873318034	Glyco_hydro_46 Glyco_hydro_46
FFUJ_11537	9.92075556164426	NmrA
FFUJ_10344	9.88492486419858	
FFUJ_03481	9.6541550681412	Oxidored_FMN
FFUJ_06160	9.51075584206933	
FFUJ_03267	9.37383889553225	DUF1295
FFUJ_12719	9.36981134201641	Polyketide_cyc2
FFUJ_11805	9.29844840798859	Ammonium_transp
FFUJ_11045	9.29780391099565	
FFUJ_00148	9.24561956265853	Semialdehyde_dh Epimerase PARG_cat Semialdehyde_dh Epimerase PARG_cat
FFUJ_02346	9.22500696227011	MFS_1 DUF1049
FFUJ_01996	9.15316063696758	
FFUJ_11953	9.10999334427224	
FFUJ_03105	9.04618813351136	DNA_photolyase FAD_binding_7
FFUJ_07759	8.80083250290191	NmrA NmrA
FFUJ_08281	8.79314951540086	
FFUJ_09319	8.72230839048706	Hemerythrin DUF1722 CTK3_C Hemerythrin
FFUJ_00469	8.70569815681497	Glyco_hydro_3 Glyco_hydro_3_C PA14 Fn3-like Glyco_hydro_3 Glyco_hydro_3_C PA14 Fn3-like
FFUJ_11824	8.66440091390016	Abhydrolase_3
FFUJ_07396	8.11201320044965	CsbD CsbD CsbD CsbD
FFUJ_03452	8.00715647794423	XFP_N XFP XFP_C
FFUJ_11854	7.99805942329737	Reticulon
FFUJ_01296	7.99473381548248	
FFUJ_10167	7.96199519072465	DUF3123
FFUJ_08404	7.77358451436641	DUF2263
FFUJ_14684	7.61518982795355	CN_hydrolase
FFUJ_07032	7.5866343163526	
FFUJ_04228	7.58221833255007	
FFUJ_14510	7.57496908151513	Glyoxalase
FFUJ_07352	7.55818588248198	polyprenyl_synt polyprenyl_synt
FFUJ_06982	7.50681016473545	Alpha_GJ Podoplanin SKG6 Alpha_GJ Podoplanin SKG6
FFUJ_14823	7.3528318872799	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_14760	7.3150108284774	His_Phos_2
FFUJ_03978	7.26176377466457	Hydrophobin Hydrophobin
FFUJ_08327	7.24984424132985	DUF4072 UBA2_C
FFUJ_06923	7.18466056984783	DUF3429 DUF3429
FFUJ_11846	7.13918803105981	Thioredoxin
FFUJ_05514	7.11927337118431	

FFUJ_13276	7.11715176454204	Apolipoprotein DUF883 YtxH
FFUJ_14666	7.09434750470982	Oxidored_molyb SLBB Mo-co_dimer Glyco_hydro_127
FFUJ_06781	7.09149597029975	ADH_N ADH_zinc_N ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_11961	7.0575625006052	bZIP_1 Snf7
FFUJ_11530	7.04011990218005	CoA_transf_3 FAD_binding_3
FFUJ_02691	6.99410764279176	DUF2823 Phe_tRNA-synt_N LEA_4
FFUJ_11705	6.9578423938485	PBP
FFUJ_10900	6.93026250544282	
FFUJ_08931	6.91912689619171	PALP adh_short
FFUJ_05190	6.86504891532379	
FFUJ_02494	6.80879737385301	Frag1
FFUJ_03785	6.7375776738336	Aminotran_5 Aminotran_5
FFUJ_03407	6.71962163145814	Catalase Catalase
FFUJ_08084	6.71710695124358	FAD_binding_3
FFUJ_07367	6.6269728093067	Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr
FFUJ_04725	6.5688462576746	MoCF_biosynth MoCF_biosynth
FFUJ_13161	6.56288430266521	RTA1
FFUJ_10890	6.51529272967359	
FFUJ_08282	6.51141007818956	
FFUJ_11610	6.44218459303247	PA_decarbox
FFUJ_11712	6.39928180623707	
FFUJ_13754	6.2578192995643	PAP2
FFUJ_04556	6.2569518417325	Ferrochelatase MP Ferrochelatase MP
FFUJ_06138	6.23906569264699	
FFUJ_03368	6.22166191077862	ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_05739	6.22010959459545	
FFUJ_04336	6.21683375442869	
FFUJ_09338	6.16615006242472	Abhydrolase_1
FFUJ_02678	6.1525735531394	ABC_tran
FFUJ_11664	6.1448168038448	MFS_1
FFUJ_01212	6.12814315761798	
FFUJ_11815	6.09260833800164	GST_N GST_C Heme_oxygenase
FFUJ_11698	6.08378850282325	Trypsin_2
FFUJ_01888	6.04561874029711	
FFUJ_00845	6.01035414242782	
FFUJ_12693	5.9992410488427	adh_short adh_short
FFUJ_06546	5.9530540780908	
FFUJ_11052	5.92826525004815	
FFUJ_06562	5.92814197651955	
FFUJ_11510	5.88201311102432	Amino_oxidase
FFUJ_07384	5.88119774738154	
FFUJ_10818	5.85106806090729	
FFUJ_07699	5.74991249268655	DUF445 SPG48 DUF4449 DUF445 SPG48 DUF4449
FFUJ_13851	5.73677525579026	Abhydrolase_1 SPARC_Ca_bdg NGF Abhydrolase_4
FFUJ_06570	5.71379786711334	
FFUJ_01915	5.69860975799612	
FFUJ_06571	5.69556908853553	
FFUJ_06780	5.69099140264772	DJ-1_PfpI DJ-1_PfpI
FFUJ_11043	5.6845257790612	
FFUJ_09510	5.6481954012485	Inhibitor_I78
FFUJ_06977	5.62822498259252	DUF1264 DUF1264
FFUJ_07302	5.62611873513052	SUR7 GP38 Rhabdo_glycop TMEM52 DUF1049 Herpes_gE LYRIC SUR7 GP38 Rhabdo_glycop TMEM52 DUF1049 Herpes_gE LYRIC
FFUJ_00756	5.59504602927017	
FFUJ_08275	5.58501052700426	Sugar_tr Phage_holin_3_2
FFUJ_10993	5.57843330459067	
FFUJ_08714	5.57132315707956	zf-C3HC4_4 zf-C3HC4_3 zinc_ribbon_2 AroM LON_substr_bdg DUF2414
FFUJ_14513	5.45916385594851	Oxidored_molyb Mo-co_dimer Cyt-b5 FAD_binding_6 NAD_binding_1
FFUJ_11806	5.39869232875046	FAD_binding_3
FFUJ_13149	5.37952950563691	DUF1772 Trp_oprn_chp TMEM237

FFUJ_04757	5.35612637240635	Collagen_mid Collagen_mid
FFUJ_06705	5.32215305454874	DUF1399 DUF1399
FFUJ_00322	5.31124470405463	adh_short Wax2_C adh_short Wax2_C
FFUJ_08747	5.28528035258169	Mito_carr Mito_carr Mito_carr
FFUJ_09741	5.27645874282377	Syja_N
FFUJ_12690	5.25889612268379	
FFUJ_07916	5.24538984507152	GST_N GST_C_3 GST_N GST_C_3
FFUJ_14761	5.22825678278636	Pyr_redox_2
FFUJ_06056	5.22322191614581	
FFUJ_12437	5.2076410121743	CLP_protease Amidohydro_1
FFUJ_10800	5.20688303838748	
FFUJ_09299	5.12453109097976	Amino_oxidase
FFUJ_04367	5.1070847493344	SelR SelR
FFUJ_11546	5.10683695804826	NPP1
FFUJ_11895	5.10252024013958	
FFUJ_11900	5.10177756671418	DUF1689 Ni_hydr_CYTB
FFUJ_09104	5.07518354996702	Oxysterol_BP NDUF_B8
FFUJ_06561	5.07229973327935	
FFUJ_00691	5.07191300449434	
FFUJ_05834	5.03838022429113	
FFUJ_00033	4.99678450261351	NAD_binding_2 NAD_binding_11 NAD_binding_2 NAD_bindin g_11
FFUJ_07303	4.95436445288734	
FFUJ_04202	4.95292233923707	Ppx-GppA Ppx-GppA
FFUJ_02772	4.94780965466357	Helicase_C
FFUJ_03926	4.91990343682737	Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr
FFUJ_07673	4.91963062701566	
FFUJ_05731	4.90260999806222	
FFUJ_14529	4.86226997338563	
FFUJ_01451	4.86001241759585	
FFUJ_11486	4.81685000629316	HD
FFUJ_04484	4.81037711449321	Pkinase Pkinase
FFUJ_08269	4.80957694921069	adh_short
FFUJ_07199	4.77182124529676	
FFUJ_10874	4.76858092301782	
FFUJ_05225	4.72734448908052	Abhydrolase_1 Abhydrolase_1
FFUJ_14325	4.72698406081588	GDP_Man_Dehyd GDP_Man_Dehyd
FFUJ_05866	4.71595515665006	
FFUJ_14379	4.69000675288476	DUF4131 DUF4131
FFUJ_07454	4.66142159151411	
FFUJ_02582	4.64619594979372	FAD_binding_2 Succ_DH_flav_C DUF600
FFUJ_06194	4.63831242645358	
FFUJ_11978	4.63468086136791	NAD_binding_2 6PGD
FFUJ_11427	4.61339876827076	GATA
FFUJ_10756	4.61106499078849	
FFUJ_05779	4.5975650908664	
FFUJ_09845	4.49861218232035	C2 C2
FFUJ_06191	4.46673293873381	
FFUJ_11470	4.46444240974963	MIP DUF2104
FFUJ_09413	4.4578559547035	CsbD CsbD
FFUJ_07165	4.45377908568431	Glyco_transf_8 Glyco_transf_8
FFUJ_06958	4.3863775655605	DUF3292 Pex24p DUF3292 Pex24p
carS	4.38376359623156	
FFUJ_01909	4.38200156628702	
FFUJ_12699	4.37547607998494	F-box-like
FFUJ_00239	4.36354295738071	Gln-synt_N_2 Gln-synt_C GST_N Gln-synt_N_2 Gln- synt_C GST_N
FFUJ_07198	4.33745863734327	ATP-synt ATP-synt
FFUJ_02814	4.3319001821037	
FFUJ_06448	4.31924753677375	
FFUJ_05953	4.3152076969654	
FFUJ_08987	4.31305466094854	DUF4510 UvdE
FFUJ_04133	4.31188888167232	CIA30 CIA30



FFUJ_05482	4.30905048136358	
FFUJ_10316	4.28893663003461	
FFUJ_05300	4.27353518360021	adh_short Prp19 adh_short Prp19
FFUJ_14921	4.26545605444848	
FFUJ_00233	4.26326873972484	GST_N_3 GST_C_2 GST_N_3 GST_C_2
FFUJ_11685	4.25898603685431	
FFUJ_00473	4.2573331793321	
FFUJ_14913	4.24304506075227	PAS_3 PAS
FFUJ_10474	4.23006549185965	
FFUJ_13729	4.2150507453538	PSDC PS_Dcarbxyase Biotin_lipoyl_2
FFUJ_01907	4.21478780500682	
FFUJ_07045	4.20582843335721	F-box-like F-box-like
FFUJ_07211	4.20271026363375	Con-6 Con-6 SpoIIAH Con-6 Con-6 SpoIIAH
FFUJ_05077	4.20090453167196	SnoaL_3 SnoaL_3
FFUJ_03411	4.19525934852117	Fasciclin Fasciclin
FFUJ_05502	4.19499764278726	
FFUJ_09742	4.18370172789136	Tannase
FFUJ_11851	4.17923823215922	adh_short DUF1771 Glyco_transf_4 Toprim_4
FFUJ_09818	4.11721845935753	
FFUJ_09438	4.08662538594736	
FFUJ_10526	4.0835672872415	
FFUJ_12375	4.08325594266438	NmrA DUF2853
FFUJ_04548	4.05499461905728	Pyridox_oxase_2 Pyridox_oxase_2
FFUJ_08838	4.04615054722897	SNF2_N AT_hook Helicase_C
FFUJ_05984	4.04048926425247	
FFUJ_00345	4.02824100303868	AhpC-TSA_2 AhpC-TSA_2
FFUJ_06987	4.02664978398034	Aldo_ket_red Aldo_ket_red
FFUJ_11509	4.02196353066367	Metallophos
FFUJ_08013	4.01705997197354	Rieske Pyr_redox_2 Reductase_C Rieske Pyr_redox_2 Reductase_C
FFUJ_02679	3.96835199708365	AF-4 SR-25
FFUJ_05570	3.96749938657009	
FFUJ_12300	3.96411825305632	PLA2_B RE_NgoPII THOC7
FFUJ_05185	3.95067727637268	DUF2207 Asp4 UAA Cation_efflux ZT_dimer DUF2207 Asp4 UAA Cation_efflux ZT_dimer
FFUJ_06003	3.93935654791267	
FFUJ_10256	3.93739103961585	
FFUJ_08504	3.93245430045982	ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_10073	3.92774154523498	Glyco_hydro_76
FFUJ_08523	3.9022873051464	
FFUJ_03136	3.90207092239039	Epimerase NAD_binding_4
FFUJ_00427	3.89231912710462	malic Malic_M malic Malic_M
FFUJ_09141	3.88353373974235	Histone
FFUJ_06049	3.86768419400487	
FFUJ_07745	3.86310261455797	Glyco_hydro_43 Glyco_hydro_43 Glyco_hydro_43 Glyco_hydro_43
FFUJ_02390	3.85903465589981	PAN_4 PAN_4
FFUJ_07815	3.84445741839293	GATase GATase
FFUJ_11380	3.84429753522841	Polyketide_cyc2 DUF4520
FFUJ_04800	3.84187345558182	hGDE_N hDGE_amylase hGDE_central GDE_C hGDE_N hDGE_amylase hGDE_central GDE_C
FFUJ_02297	3.83726925479076	Sugar_tr
FFUJ_13702	3.82415235042852	Exo_endo_phos
FFUJ_06310	3.80886195210971	
FFUJ_10898	3.77977406419504	
FFUJ_09693	3.77349143602133	
FFUJ_11872	3.76936107394314	Abhydrolase_3
FFUJ_06205	3.72608348748722	
FFUJ_13436	3.71723526573071	Sugar_tr
FFUJ_07503	3.70137164466963	Aldedh Aldedh
FFUJ_01741	3.69411812651502	
FFUJ_11221	3.68664883066703	zf-H2C2_2 Fungal_trans
FFUJ_11487	3.67817468935412	Ank_2 Ank_2 Ank_2 Ank_2

FFUJ_01091	3.63768343585373	
FFUJ_08800	3.62188314374762	DUF466
FFUJ_10815	3.6179688833732	
FFUJ_14045	3.60710145099311	Glyco_hydro_36N Glyco_transf_36 Melibiase Glyco_hydro_36C Glyco_hydro_36N Glyco_transf_36 Melibiase Glyco_hydro_36C
FFUJ_09580	3.60675143266828	AAR2
FFUJ_10702	3.59382460380244	
FFUJ_06242	3.57491762750412	
FFUJ_06373	3.54380691372749	
FFUJ_11951	3.5417932546322	
FFUJ_13168	3.5207187910392	DUF2985 EF-hand_1 MS_channel DUF2648
FFUJ_13183	3.5198647629314	Cytochrom_B561 DUF2306
FFUJ_08100	3.51114116314568	FMO-like
FFUJ_02317	3.50817325834211	adh_short adh_short
FFUJ_10747	3.50309472576636	
FFUJ_09461	3.50302188171676	HIT
FFUJ_11697	3.48613877280305	
FFUJ_11397	3.48435108994591	ArAE_2_N FUSC_2 ArAE_2
FFUJ_07140	3.47877651566769	SOG2 SOG2
FFUJ_14044	3.47496874060249	Amidohydro_1 Amidohydro_1
FFUJ_10726	3.4669571365377	
FFUJ_00722	3.4642186714477	
FFUJ_11277	3.45862835969805	
FFUJ_06265	3.44575469729988	
FFUJ_01463	3.43800108472192	
FFUJ_13069	3.43771513172349	
FFUJ_06427	3.43771513172349	
FFUJ_03861	3.43292895308379	SUR7 LMBR1 LMBR1 SUR7 LMBR1 LMBR1
FFUJ_01405	3.4320486417137	
FFUJ_04604	3.43019358965544	
FFUJ_14895	3.42470566135528	DNA_pol_E_B
FFUJ_00720	3.42430213486804	
FFUJ_10457	3.42268850433057	
FFUJ_04810	3.42050656737433	NAD_binding_10 DHHA1 NAD_binding_10 DHHA1
FFUJ_07608	3.41006679866537	Ish1 Ish1 Ish1 Ish1 Slx4 Ish1 Ish1 Thymopoietin HeH Ish1 Ish1 Ish1 Ish1 Ish1 Slx4 Ish1 Ish1 Thymopoietin HeH Ish1 Ish1
FFUJ_09572	3.39833952955175	IncA Uds1 HR1 RICTOR_N RICTOR_M RasGEF_N_2 RICTOR_V
FFUJ_00279	3.39678522246293	
FFUJ_00149	3.39622019615782	
FFUJ_02652	3.39417276356518	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_02368	3.39026959181086	ProQ TBPIP
FFUJ_11535	3.38810832165593	
FFUJ_13511	3.37975811886886	Glyco_hydro_15 CBM_20
FFUJ_10819	3.37626934274581	
FFUJ_11505	3.37514620883912	
FFUJ_04669	3.3495098628562	HIRAN SNF2_N zf-C3HC4_3 Helicase_C HIRAN SNF2_N zf-C3HC4_3 Helicase_C
FFUJ_01916	3.32429865579018	
FFUJ_03410	3.31911818298275	Zn_clus
FFUJ_08405	3.31277449367689	tRNA_anti-codon tRNA-synt_2
FFUJ_06257	3.29162503336168	
FFUJ_13647	3.29157940206575	NEMO AAA Vps4_C
FFUJ_10899	3.27387672636322	
FFUJ_07874	3.2685029516186	adh_short adh_short
FFUJ_07275	3.26827640410967	GFA DNA_ligase_ZBD GFA DNA_ligase_ZBD
FFUJ_11459	3.25730767818512	FAD_binding_3
FFUJ_12722	3.24898706508465	Glyco_hydro_43
FFUJ_01016	3.23149105917161	
FFUJ_03451	3.23003545280897	Catalase Catalase-rel DJ-1_PfpI
FFUJ_00164	3.21353235940942	DUF21 PTS_EIIC_2 HisKA_7TM Glucos_trans_II PLDc_N DUF

		3951 ATP-synt_J DUF21 PTS_EIIC_2 HisKA_7TM Glucos_trans_II PLDc_N DUF3951 ATP-synt_J
FFUJ_00247	3.20868018334917	NUDIX DUF2163 NUDIX DUF2163
FFUJ_06002	3.20221461127797	
FFUJ_02352	3.19886475954437	Bac_rhodopsin DUF2754 PHBC_N
FFUJ_02581	3.19751250215077	
FFUJ_05481	3.19480970204286	
FFUJ_11665	3.18735563628369	Abhydrolase_6
FFUJ_02606	3.18102122912968	zf-H2C2_2 zf-H2C2_2 zf-C2HE zf-H2C2_2 DUF2675
FFUJ_04347	3.17406131998145	Glyoxalase Glyoxalase Glyoxalase Glyoxalase
FFUJ_11091	3.170960706168	
FFUJ_01361	3.15580923773681	
FFUJ_09936	3.15550301095669	GAF HisKA HATPase_c Response_reg
FFUJ_03404	3.15524055451026	ADH_N ADH_zinc_N NMO RYDR_ITPR
FFUJ_09958	3.14999600738498	Cerato-platanin
FFUJ_12878	3.14162285800313	FAD_binding_4 ALO
FFUJ_13895	3.12893133780634	Cupin_2 Cupin_2
FFUJ_00230	3.12024648541982	FAM76 Borrelia_P83 FAM76 Borrelia_P83
FFUJ_01908	3.11996533538008	
FFUJ_03848	3.11845188595193	DUF4440 DUF4440
FFUJ_11876	3.1120386974495	NACHT
FFUJ_09624	3.10960212784404	PKD_channel CCDC106
FFUJ_07878	3.0990155629193	FUN14 FUN14
FFUJ_08783	3.0990155629193	Methyltransf_33 DinB_2 FGE-sulfatase
FFUJ_14685	3.09746933557816	
FFUJ_11614	3.09506562633523	DUF4267
FFUJ_03953	3.07876126186894	
FFUJ_09086	3.07635074681999	PX DUF3782 RPN7
FFUJ_14382	3.07223803614828	PDDEXK_5 PDDEXK_5
FFUJ_07825	3.06632368979163	DUF4449 DUF4449
FFUJ_01910	3.06216070758441	
FFUJ_09758	3.05666829151513	MHYT MHYT MHYT MHYT IF3_C DUF4639
FFUJ_10667	3.05374585446519	
FFUJ_04339	3.04750798296808	Pox_Ag35 Voldacs DUF2461 Pox_Ag35 Voldacs DUF2461
FFUJ_05114	3.04651533003361	RSN1_TM PHM7_cyt PHM7_cyt RSN1_7TM PHM7_ext RSN1_TM PHM7_cyt PHM7_cyt RSN1_7TM PHM7_ext
FFUJ_10549	3.03904913420428	
FFUJ_03310	3.03850149138526	
FFUJ_06164	3.03387153921245	
FFUJ_04587	3.00192930063128	Glyco_transf_15 Glyco_transf_15
FFUJ_10810	3.00190849291509	
FFUJ_06722	3.00032752842106	PLDc_2 PLDc_2 PLDc_2 PLDc_2
FFUJ_03606	2.99025807092298	Ceramidase
FFUJ_09999	2.97726987339937	SMP_LBD C2
FFUJ_01223	2.96933527336982	
FFUJ_03555	2.96752462163901	Abhydrolase_3
FFUJ_07015	2.95260834537324	MCU Glyco_trans_4_4 DUF1281 MCU Glyco_trans_4_4 DUF1281
FFUJ_11686	2.94788450035564	BPD_transp_2 PAP2
FFUJ_00204	2.93077050151562	ADH_N_2 ADH_zinc_N ADH_N_2 ADH_zinc_N
FFUJ_10495	2.92435812795519	
FFUJ_03253	2.9204688561981	Snoal_2
FFUJ_01273	2.91559433018606	
FFUJ_12314	2.90150215417885	ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_06818	2.89437128461087	MFS_1 PIRT MFS_1 PIRT
FFUJ_04875	2.89268654587451	Transglut_core Rad4 BHD_1 BHD_2 BHD_3 Transglut_core Rad4 BHD_1 BHD_2 BHD_3
FFUJ_05523	2.89064211000412	
FFUJ_13344	2.88489737795951	Heme_oxygenase
FFUJ_05474	2.87380067331017	
FFUJ_05701	2.87306374008414	
FFUJ_11829	2.86318323226719	MFS_1 MFS_1

FFUJ_09625	2.85820619850681	Macro
FFUJ_06057	2.85818638699979	
FFUJ_11800	2.84760689576447	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_06155	2.81592712866481	
FFUJ_11536	2.81097378640349	DNase_II Fungal_trans
FFUJ_05665	2.79223429024903	
FFUJ_02280	2.79173112396558	HisKA HATPase_c Response_reg
FFUJ_04078	2.78944866246326	Abhydrolase_1 Abhydrolase_1
FFUJ_13887	2.7861057148397	CoA_trans CoA_trans CoA_trans CoA_trans
FFUJ_13753	2.78554572854068	Bromodomain Peptidase_S41
FFUJ_04672	2.7840594144768	PNISR Nop53 PBP1_TM DUF2370 PNISR Nop53 PBP1_TM DUF2370
FFUJ_04121	2.78060728085725	OPT OPT
FFUJ_07872	2.77846872285128	MBOAT PAP2 MBOAT PAP2
FFUJ_04572	2.77277393911336	PMI_typeI Hanta_G1 PMI_typeI Hanta_G1
FFUJ_14569	2.7706606104	DLH
FFUJ_04348	2.76973893545065	2-Hacid_dh 2-Hacid_dh_C ACT 2-Hacid_dh 2-Hacid_dh_C ACT
FFUJ_07383	2.7666497223594	GATA GATA
FFUJ_07670	2.76316171720237	Helo_like_N DUF3915 Helo_like_N DUF3915
FFUJ_09927	2.75744096692276	
FFUJ_02493	2.75079761526895	DUF3812
FFUJ_01211	2.74601593994867	
FFUJ_00718	2.74272504322624	
FFUJ_13992	2.73905834996427	Glyco_hydro_cc Glyco_hydro_cc
FFUJ_13570	2.72464826683231	
FFUJ_04249	2.7205908390395	EST1_DNA_bind EST1_DNA_bind
FFUJ_07309	2.7178013306967	zf-CCHC zf-C2H2_10 zf-C2H2_10 zf-CCHC zf-CCHC zf-CCHC zf-CCHC zf-CCHC zf-CCHC zf-C2H2_10 zf-C2H2_10 zf-C2H2_10 zf-C2H2_10 zf-CCHC zf-CCHC zf-CCHC zf-CCHC zf-CCHC zf-CCHC zf-C2H2_10 zf-CCHC
FFUJ_01563	2.7169537365444	
FFUJ_12299	2.68252199457995	Tmp39 La RRM_1
FFUJ_05604	2.68064467540925	
FFUJ_13708	2.67951148540142	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_14571	2.67429756345506	AA_permease
FFUJ_06959	2.67301882881753	DUF1451 Lactamase_B DUF1451 Lactamase_B
FFUJ_00585	2.67098153058612	
FFUJ_05479	2.6655070539222	
FFUJ_05987	2.66002535985844	
FFUJ_10854	2.65483095299996	
FFUJ_10418	2.65183313942697	
FFUJ_04896	2.64615945566272	Acetyltransf_9 Acetyltransf_9
FFUJ_10520	2.63747971862628	
FFUJ_00208	2.63185498704086	MFS_1 FAM176 DUF4632 MFS_1 FAM176 DUF4632
FFUJ_05577	2.62431336478976	
FFUJ_02214	2.61715614291002	ThuA DUF2194
FFUJ_13701	2.61704730070925	adh_short adh_short
FFUJ_07310	2.61581407207577	Aft1_OSA Aft1_HRA Aft1_HRR bZIP_1 Aft1_OSA Aft1_HRA Aft1_HRR bZIP_1
FFUJ_08020	2.6131682206382	
FFUJ_13474	2.6099822584485	Aldo_ket_red
FFUJ_00721	2.60896935801365	
FFUJ_05614	2.60560790182058	
FFUJ_09527	2.60405514466805	zf-C2H2
FFUJ_09006	2.60051975951939	DJ-1_PfpI
FFUJ_01291	2.60032148735492	
FFUJ_05854	2.59763728949273	
FFUJ_11068	2.5900500917416	
FFUJ_00965	2.58561952932922	
FFUJ_06556	2.58311164551738	
FFUJ_00026	2.57822826637087	MARVEL Flp_Fap MARVEL Flp_Fap
FFUJ_05836	2.5710898003443	

FFUJ_13147	2.56631808879288	
FFUJ_01266	2.5650732055245	
FFUJ_01852	2.56237210933412	
FFUJ_07677	2.56201691375434	PTCB-BRCT PTCB-BRCT BRCT_2 PTCB-BRCT PTCB-BRCT PTCB-BRCT BRCT_2 PTCB-BRCT
FFUJ_01869	2.55210909269744	
FFUJ_03384	2.54802600194794	Scs3p
FFUJ_10711	2.54310318541247	
FFUJ_03782	2.54255679322887	adh_short Glyco_hydro_99 adh_short Glyco_hydro_99
FFUJ_12988	2.53977377905262	
FFUJ_01952	2.53325094822806	
FFUJ_04289	2.52527411691018	HTH_20 YjeF_N ABC_sub_bind HTH_20 YjeF_N ABC_sub_bind
FFUJ_06307	2.52448656575613	
FFUJ_09428	2.51324270557913	ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_01397	2.51214545550152	
FFUJ_01494	2.50407886480724	
FFUJ_02367	2.50218767155073	AT_hook AT_hook CAF20 UvrD_C_2 Exonuc_VII_L AAA_13 Hemagglutinin DUF2408 Baculo_PEP_C SPX
FFUJ_04007	2.49754383615665	ADH_N ADH_zinc_N Glyco_trans_4_2 ADH_N ADH_zinc_N Glyco_trans_4_2
FFUJ_13596	2.49615928769579	
FFUJ_11239	2.49536351991155	Fe-ADH
FFUJ_00492	2.49491385034315	
FFUJ_12444	2.49427407566098	
FFUJ_11420	2.49264943989045	LIP
FFUJ_09661	2.49256305274086	
FFUJ_08864	2.49218298484881	CRAL_TRIO_N CRAL_TRIO
FFUJ_06745	2.48821301612658	NmrA NmrA
FFUJ_13453	2.48654062150749	zf-rbx1
FFUJ_04877	2.48581684064592	MTP18 MTP18
FFUJ_06275	2.48319920369748	
FFUJ_07659	2.47682167179168	CAP CAP
FFUJ_01724	2.47393912317263	
FFUJ_07824	2.47219064133597	PXB DUF3818 DUF3818 PXB DUF3818 DUF3818
FFUJ_05950	2.46951888261783	
FFUJ_02489	2.46888562000717	Polyketide_cyc
FFUJ_13797	2.46866316088626	DUF89
FFUJ_13427	2.46491859198645	GAF_2 HisKA HATPase_c Response_reg
FFUJ_12370	2.46389367430346	
FFUJ_10026	2.46370581896028	Pro_CA PNP_UDP_1
FFUJ_00951	2.46228882668983	
FFUJ_10879	2.46070208061548	
FFUJ_00122	2.45814496712377	Pkinase Pkinase
FFUJ_10554	2.45591392850213	
FFUJ_04978	2.45533521136077	
FFUJ_10095	2.45443336542567	DUF1295 DUF2062
FFUJ_02734	2.45394004277492	MutS_I MutS_II MutS_III DUF4911 MutS_IV MutS_V
FFUJ_14694	2.45191675680836	Glyco_hydro_32N Glyco_hydro_32C
FFUJ_03778	2.44921597804405	RTA1 RTA1
FFUJ_13595	2.44560261506228	CP2 Tektin
FFUJ_06723	2.44102995635136	Zn_clus Fungal_trans Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_07144	2.43422073923659	DUF1761 DUF1761
FFUJ_01895	2.42771656951103	
FFUJ_05600	2.42692579882552	
FFUJ_03471	2.42534503009458	FMO-like
FFUJ_06223	2.42347970338446	
FFUJ_05767	2.41864662404452	
FFUJ_04060	2.41465989553235	Amidase YolD Amidase YolD
FFUJ_10693	2.41226766929709	
FFUJ_10029	2.40750701199073	Acyl_transf_3 DUF1772
FFUJ_00751	2.40678955353652	
FFUJ_07805	2.40580548172968	Pyr_redox_2 EF-hand_1 Pyr_redox_2 EF-hand_1
FFUJ_05994	2.40560538077736	

FFUJ_04257	2.40548866290787	AAA_23 IQ DUF1246 AAA_23 IQ DUF1246
FFUJ_11469	2.4051385432766	SKI
FFUJ_04856	2.40450512300037	Nuf2 PI3K_P85_iSH2 Reo_sigmaC Nuf2 PI3K_P85_iSH2 Reo_sigmaC
FFUJ_05686	2.40145703961162	
FFUJ_02539	2.39912778151075	ABC1
FFUJ_06202	2.3986455748665	
FFUJ_09806	2.39809697485415	
FFUJ_14512	2.39149039996418	Aldo_ket_red
FFUJ_03043	2.38887273899268	MutS_I MutS_II MutS_III MutS_IV DUF494 MutS_V
FFUJ_13670	2.38753188471166	DUF2427 Ytp1
FFUJ_05908	2.38718437869509	
FFUJ_00739	2.38561295951815	
FFUJ_03526	2.38339818983378	WSC
FFUJ_07008	2.37607438232693	Zn_clus Fungal_trans Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_04959	2.37376974376291	
FFUJ_06176	2.36877307972783	
FFUJ_02509	2.36745991714217	Asparaginase Ank_2
FFUJ_01518	2.36465547263387	
FFUJ_07065	2.36388524259442	
FFUJ_09944	2.36345926567831	Sod_Fe_N Sod_Fe_C
FFUJ_03412	2.36332821130183	DUF924
FFUJ_03576	2.3627058022466	adh_short Flavin_Reduct
FFUJ_06990	2.36079046665069	p450 p450
FFUJ_13553	2.35876223309421	DNA_ligase_A_N DNA_ligase_A_M DNA_ligase_A_C
FFUJ_05729	2.35019424279963	
FFUJ_09808	2.34755669449488	
FFUJ_12986	2.34441829375177	EcKinase
FFUJ_06144	2.34368714566751	
FFUJ_09674	2.34302118704527	Aldo_ket_red
FFUJ_01879	2.34300494651626	
FFUJ_09771	2.34206318841609	Zn_clus Fungal_trans_2
FFUJ_06721	2.34050524810099	F-box-like Baculo_p47 F-box-like Baculo_p47
FFUJ_06052	2.34029435670296	
FFUJ_04822	2.33838098054455	Exo5 Exo5
FFUJ_04031	2.33562717162649	Pkinase Pkinase
FFUJ_01664	2.33481784518575	
FFUJ_01546	2.33400879918758	
FFUJ_07464	2.32949946643282	SCP2 SCP2
FFUJ_13125	2.32590149812014	PAF-AH_p_II
FFUJ_00792	2.32583701133149	
FFUJ_13182	2.32520835883325	PAS_3 PAS PAS_3 HisKA HATPase_c Response_reg
FFUJ_10992	2.324708781907	
FFUJ_05873	2.32367773680084	
FFUJ_02977	2.31344050911203	MFS_2 UPF0154
FFUJ_08715	2.30842682338279	
FFUJ_09849	2.30652351380099	4F5
FFUJ_11506	2.3010462797011	ABM DUF629
FFUJ_07286	2.30055189405897	
FFUJ_14814	2.30044027329279	HET Med30
FFUJ_01331	2.29750818308205	
FFUJ_07599	2.29730116593774	MBOAT MBOAT
FFUJ_08866	2.28140092049998	adh_short
FFUJ_08745	2.28084751631552	Fer2_3 Fer4_17
FFUJ_04063	2.27820883556813	MFS_1 MFS_1
FFUJ_02092	2.26405656061783	Pyr_redox_2
FFUJ_13245	2.26303672950127	FRQ FlxA FRQ
FFUJ_08451	2.26139028031556	DUF2183
FFUJ_08413	2.25833576629863	XPG_N XPG_I TniB HHH_5
FFUJ_14635	2.25785055711887	Acyl-CoA_ox_N Acyl-CoA_dh_M Acyl-CoA_dh_1 ACOX
FFUJ_10368	2.25536354167647	
FFUJ_06185	2.25391014221853	
FFUJ_12027	2.25389451935807	Abhydrolase_6

FFUJ_06051	2.25094374221689	
FFUJ_08537	2.24843316449163	Ribonuc_red_sm
FFUJ_03143	2.24175715129593	Lactamase_B_2
FFUJ_06922	2.24039016471733	Chorein_N VPS13 VPS13_mid_rpt AP4E_app_platf SHR-BD VPS13_C ATG_C VPS13_C Chorein_N VPS13 VPS13_mid_rpt AP4E_app_platf SHR-BD VPS13_C ATG_C VPS13_C
FFUJ_00826	2.24015723880753	
FFUJ_03813	2.23950517508401	Tyrosinase Tyrosinase
FFUJ_13389	2.23818610301111	TSC22 SYCE1 DDE_Tnp_IS240
FFUJ_04745	2.23781379980643	Anoctamin Anoctamin
FFUJ_08801	2.23511645300899	HD_3
FFUJ_02424	2.23146317727222	HisKA HATPase_c Response_reg
FFUJ_02467	2.22983969910094	HTH_31 Cyanate_lyase
FFUJ_09514	2.22920609022674	
FFUJ_13273	2.22889707806306	DnaJ
FFUJ_00882	2.22826373703461	
FFUJ_05942	2.22793941254702	
FFUJ_00449	2.2238199715612	Pkinase Pkinase
FFUJ_13522	2.2237737290057	NuiA
FFUJ_02315	2.22337300046856	SMP SMP Ifi-6-16
FFUJ_04779	2.2224947328849	Zn_clus Zn_clus
FFUJ_06378	2.22238689938392	
FFUJ_13226	2.21946198752587	Drc1-Sld2 DNA_pol_delta_4 DUF1886
FFUJ_05874	2.21873905079619	
FFUJ_05855	2.21469802481727	
FFUJ_12295	2.21325548982597	
FFUJ_11847	2.2127953041333	tRNA-synt_2c KASH_CCD tRNA_SAD
FFUJ_10366	2.21074097594156	
FFUJ_00450	2.2100208798731	DUF3342 CHORD DUF3342 CHORD
FFUJ_04933	2.20919382500525	DAO SE DAO SE
FFUJ_08442	2.20168793916528	Drc1-Sld2
FFUJ_05205	2.1965053296155	RRM_1 RRM_1 RRM_1 RRM_1 RRM_1 RRM_1
FFUJ_00377	2.19582031079096	Mucin-like DZR Mucin-like DZR
FFUJ_01780	2.19417713711671	
FFUJ_01607	2.18829918899484	
FFUJ_05659	2.18784419227952	
FFUJ_04988	2.18696480020096	DUF4629 Zn_clus Fungal_trans_2 Fungal_trans_2 DUF4629 Zn_clus Fungal_trans_2 Fungal_trans_2
FFUJ_05051	2.18588878417046	Mit_KHE1 Mit_KHE1
FFUJ_01475	2.18236135102823	
FFUJ_06204	2.17803932125576	
FFUJ_13345	2.17788835630639	WD40
FFUJ_10801	2.17621334789635	
FFUJ_13611	2.17568545928099	PH
FFUJ_06058	2.17551957787837	
FFUJ_08868	2.16886461526685	UPF0121
FFUJ_07304	2.16721156890697	Med1 Med1
FFUJ_03256	2.16504948502128	
FFUJ_12706	2.1649444387135	Methyltransf_18
FFUJ_11706	2.1598632916088	peroxidase peroxidase
FFUJ_14434	2.15954892282755	UPF0203 Cmc1 UCR_hinge COX17 DUF1638
FFUJ_01726	2.15932440171265	
FFUJ_03084	2.15880060988422	RmlD_sub_bind
FFUJ_14238	2.15841158963496	FERM_M Peptidase_C48 FERM_M Peptidase_C48
FFUJ_13229	2.15721504389227	Glyco_hydro_72
FFUJ_06610	2.15714028181153	
FFUJ_01588	2.14711579717193	
FFUJ_02510	2.1449588937372	Pkinase T2SSK
FFUJ_02937	2.14278930430303	
FFUJ_09701	2.14137876382071	Peptidase_M19
FFUJ_00832	2.13990982013834	
FFUJ_13608	2.13792315780989	CDP-OH_P_transf
FFUJ_03511	2.13709345742047	YL1 RIO1

FFUJ_08649	2.13556824202887	Glyco_transf_28 UDPGT ATG_C Pox_A_type_inc
FFUJ_04705	2.13450271849804	Reticulon DUF1043 Reticulon DUF1043
FFUJ_00724	2.12888792305884	
FFUJ_08867	2.12791422824073	
FFUJ_14400	2.12758976227614	
FFUJ_13258	2.12143430056921	DNA_pol_B_exo1 DNA_pol_B DUF1744
FFUJ_14511	2.1174090468075	Hydrolase_6 Hydrolase_like
FFUJ_09747	2.11733566427359	zf-C2H2 zf-C2H2 zf-C2H2
FFUJ_07672	2.11671935138569	AAA AAA
FFUJ_02466	2.11503274592982	
FFUJ_01891	2.11315706103298	
FFUJ_03233	2.11147329401592	Fungal_trans
FFUJ_04584	2.10974699721556	NACHT_N NACHT_N
FFUJ_10233	2.10964463413612	
FFUJ_09890	2.10907441646257	SET
FFUJ_08650	2.10790522147393	Kinetochor_Ybp2
FFUJ_13087	2.10756919789066	EcoEI_R_C LRR_8
FFUJ_02416	2.10707256549355	Cyt-b5 Oxidored_molyb Mo-co_dimer BNR
FFUJ_11711	2.10225838588894	DUF1477 Baculo_PEP_C
FFUJ_04695	2.10061242342386	MFS_1 MFS_1 MFS_1 MFS_1
FFUJ_13428	2.09889500624618	PAP2_3 PAP2_3
FFUJ_03421	2.09608903625076	Apolipoprotein
FFUJ_00922	2.09425918369291	
FFUJ_14547	2.09199586502383	Glyco_hydro_18
FFUJ_12960	2.09072020041033	Peptidase_S10
FFUJ_13885	2.0875923206077	Chromo Chromo Chromo Chromo
FFUJ_09595	2.0852494820942	DUF498
FFUJ_04158	2.08292371055083	NPC1_N Folate_rec Sterol-sensing Patched NPC1_N Folate_rec Sterol-sensing Patched
FFUJ_11507	2.07972099993913	
FFUJ_09324	2.07650882051397	PBP
FFUJ_02666	2.07564540432816	DUF4679 OmpH
FFUJ_08978	2.07504122661794	
FFUJ_10649	2.07483987313122	
FFUJ_06096	2.07364653582608	
FFUJ_09934	2.073359087301	adh_short adh_short
FFUJ_03409	2.07060160802257	
FFUJ_05522	2.06999889845778	
FFUJ_04251	2.0687366472321	zf-H2C2_2 zf-H2C2_2 zf-H2C2_2 zf-H2C2_2
FFUJ_05991	2.06817748661373	
FFUJ_01373	2.06685903975991	
FFUJ_02492	2.06634335459705	nec1 Y_phosphatase3 AA_permease_C Y_phosphatase3 Y_phosphatase3C
FFUJ_03508	2.06210815179057	Pex14_N Choline_transpo
FFUJ_03646	2.05779604639667	
FFUJ_01917	2.05384883215805	
FFUJ_01839	2.05121682393459	
FFUJ_02373	2.04908523951557	Abhydrolase_5
FFUJ_04778	2.04813384762011	
FFUJ_10491	2.04783574109457	
FFUJ_10045	2.04706938067977	Guanylin DUF924
FFUJ_12434	2.0449704553163	Helo_like_N DUF1664 Chitin_synth_1N
FFUJ_07430	2.04314274206998	PGAP1 DUF4872 PGAP1 DUF4872
FFUJ_13886	2.0415572151247	AA_permease_2 AA_permease_2
FFUJ_12212	2.03947807809575	HHH_8 DNA_pol_lambd_f DNA_pol_B_palm DNA_pol_B_thumb
FFUJ_03398	2.03591876821029	ERG4_ERG24
FFUJ_00994	2.02855159907935	
FFUJ_02868	2.02725841341665	
FFUJ_02470	2.0263312011427	Sterol-sensing
FFUJ_11513	2.02572733646275	MFS_1 YibE_F
FFUJ_04964	2.02555884820706	LON_substr_bdg AAA ClpB_D2-small Lon_C LON_substr_bdg AAA ClpB_D2-small Lon_C



FFUJ_08551	2.02387473622101	DNA_pol_alpha_N DNA_pol_B_exo1 DNA_pol_B zf-DNA_Pol
FFUJ_01914	2.02296309361105	
FFUJ_02668	2.02247237922983	DNA_pol_B_exo1 DNA_pol_B DUF2614 C1_1 zf-C4pol
FFUJ_09662	2.02220604127309	DUF4604 XAP5 Glucokinase
FFUJ_08665	2.02130916091597	
FFUJ_01190	2.01796338827826	
FFUJ_04805	2.01780953212417	RSN1_TM SSP160 PHM7_cyt CMV_US RSN1_7TM RSN1_TM SP160 PHM7_cyt CMV_US RSN1_7TM
FFUJ_01154	2.01239010365232	
FFUJ_04526	2.01145574933743	MscL DUF3329 ATP-synt_E C1_1 Zn_ribbon_17 MscL DUF3329 ATP-synt_E C1_1 Zn_ribbon_17
FFUJ_13779	2.01145574933743	Complex1_LYR_2 DUF3135
FFUJ_13362	2.0099644710989	HAD_2 UDPG_MGDP_dh_C
FFUJ_07875	2.00730521749124	ARD ARD
FFUJ_08932	2.00667920404978	ComA DUF2542
FFUJ_13559	2.00405207883423	TPR_16 TPR_11 TPR_12 TPR_11 TPR_14 Coatomer_WDAD DUF4192 TPR_16 DUF4192 TPR_2 TPR_19

### Anexo 1.B Genes reprimidos por luz en la estirpesilvestre

FFUJ_06547	0.0459057919279876	
FFUJ_11613	0.0462747818775906	
FFUJ_02291	0.0654052384858929	
FFUJ_10246	0.0714199037557888	
FFUJ_11430	0.0845084843312103	Pro-kuma_activ Peptidase_S8
FFUJ_10146	0.0870694246290145	PA14_2
FFUJ_14009	0.0889217406663706	RL11D Mid2 RL11D Mid2
FFUJ_02209	0.0922114683389894	
FFUJ_10721	0.106518801032511	
FFUJ_10723	0.107227733543264	
FFUJ_12730	0.114654906538575	MMR_HSR1 YchF-GTPase_C
FFUJ_10720	0.118260484672106	
FFUJ_03721	0.125367908371942	PBP_like_2 PBP_like_2
FFUJ_02254	0.133301045420864	Chitin_bind_1 Glyco_hydro_18
FFUJ_03516	0.136151048713296	Abhydrolase_5
FFUJ_10724	0.144764523604369	
FFUJ_06661	0.145932184346835	
FFUJ_03793	0.150473360199	SH3_3 Trefoil SH3_3 Trefoil
FFUJ_03399	0.153189572230111	Glyco_hydro_3 Glyco_hydro_3_C Fn3-like
FFUJ_13786	0.154880776944859	
FFUJ_12117	0.155636246792574	MFS_1
FFUJ_01604	0.157725737311129	
FFUJ_03613	0.159461494436631	PAN_1
FFUJ_13314	0.166545698725687	DUF1772
FFUJ_14707	0.169111889751202	NmrA
FFUJ_10191	0.171379921328861	adh_short
FFUJ_14753	0.174091781117788	Asp
FFUJ_08044	0.17637524598281	DUF2207 DUF2207
FFUJ_12031	0.180422353742427	DUF3632
FFUJ_06828	0.18107258010008	ABC_membrane ABC_tran ABC_membrane ABC_tran ABC_membrane ABC_tran ABC_membrane ABC_tran
FFUJ_06662	0.183425992935524	
FFUJ_03501	0.183658808977164	Peptidase_C2 Adeno_E3
FFUJ_10875	0.185651644533851	
FFUJ_10468	0.185712135826286	
FFUJ_13190	0.188200191347324	Amino_oxidase
FFUJ_10722	0.189047411406576	
FFUJ_02036	0.192630759782644	
FFUJ_11323	0.193383954332028	
FFUJ_01277	0.19410645490447	
FFUJ_06762	0.194133365638126	MHYT MHYT MHYT MHYT
FFUJ_10200	0.19658974890664	Aminotran_1_2

FFUJ_10181	0.197955766616227	Fructosamin_kin
FFUJ_01118	0.198113623877131	
FFUJ_11412	0.199088252457962	
FFUJ_02669	0.200389663712979	ELFV_dehydrog_N ELFV_dehydrog
FFUJ_06860	0.204720857424573	p450 p450 p450 p450
FFUJ_10431	0.205293520677192	
FFUJ_03822	0.206217689709684	Abhydrolase_6 Abhydrolase_6
FFUJ_05120	0.208627320288852	MFS_1 MFS_1
FFUJ_10757	0.208647566592632	
FFUJ_10563	0.210641265628051	
FFUJ_10325	0.211415051963779	
FFUJ_12413	0.21273952463665	cobW cobW CobW_C CobW_C
FFUJ_03816	0.214188065370826	OPT OPT
FFUJ_12118	0.214916775055563	PALP Rhodanese
FFUJ_08097	0.217074174106793	2-Hacid_dh 2-Hacid_dh_C
FFUJ_08088	0.220208185140343	GPI-anchored
FFUJ_00265	0.223050146377732	AA_permease_2 YlaH AA_permease_2 YlaH
FFUJ_10194	0.223371959995335	Amidase
FFUJ_12495	0.223455583652419	COesterase
FFUJ_13349	0.223723699936866	Kinesin
FFUJ_09399	0.223779533345376	
FFUJ_13996	0.225334481186213	Hydrophobin Hydrophobin
FFUJ_02271	0.2268483387921	SurE
FFUJ_05595	0.228467364050325	
FFUJ_00260	0.228839816858111	
FFUJ_10761	0.230839177372624	
FFUJ_10798	0.2318478092919	
FFUJ_10709	0.232261188341072	
FFUJ_05097	0.233248547148113	DUF2828 DUF2828
FFUJ_03773	0.237635124556797	Abhydrolase_3 Abhydrolase_3
FFUJ_10451	0.237958187547218	
FFUJ_14675	0.238339504250265	Cu-oxidase_3 Cu-oxidase Cu-oxidase_2
FFUJ_05863	0.239965681529694	
FFUJ_04314	0.241141188684459	NAD_binding_7 SpoU_sub_bind Sirohm_synth_M Sirohm_synt h_C TP_methylase NAD_binding_7 SpoU_sub_bind Sirohm_sy nth_M Sirohm_synth_C TP_methylase
FFUJ_00414	0.241607978171354	Amidohydro_2 Amidohydro_2
FFUJ_09300	0.241611327592348	FTP
FFUJ_01441	0.24303904312394	
FFUJ_00190	0.245070714464119	Aa_trans Aa_trans
FFUJ_08417	0.246035772955531	
FFUJ_04145	0.246484699598855	HMG_CoA_synt_N HMG_CoA_synt_C HMG_CoA_synt_N HMG_C oA_synt_C
FFUJ_10192	0.2476595227188	Polysacc_deac_1
FFUJ_12991	0.251175908483096	Sugar_tr
FFUJ_10197	0.251480771623745	Oxidored_FMN
FFUJ_08170	0.252558587106265	AATase PapA_C
FFUJ_07074	0.252931740881845	Lipid_DES FA_desaturase Lipid_DES FA_desaturase
FFUJ_00264	0.253042215922892	
FFUJ_02255	0.254089735338027	Chitin_bind_1 Chitin_bind_1 Chitin_bind_1 DUF4366 Alpha_G J DUF1517 Podoplanin Syndecan
FFUJ_09685	0.25502489642099	UDPG_MGDP_dh_N UDPG_MGDP_dh_N UDPG_MGDP_dh UDP G_MGDP_dh_C UDPG_MGDP_dh_C
FFUJ_11294	0.256802294864812	Methyltransf_2
FFUJ_05797	0.258194468837176	
FFUJ_10464	0.25881802494397	
FFUJ_00634	0.259727377569657	
FFUJ_12307	0.264481735189737	GLTP
FFUJ_08160	0.266639052301161	adh_short
FFUJ_07508	0.267308941178395	
FFUJ_04215	0.269709828328714	WW KinB_sensor TPR_2 WW KinB_sensor TPR_2
FFUJ_03439	0.270807575094127	Mito_carr Mito_carr Mito_carr
FFUJ_09995	0.273052448720742	Tyrosinase

FFUJ_08241	0.273958638362425	MaoC_dehydrat_N
FFUJ_05308	0.274449002332569	MFS_1 MFS_1
FFUJ_14600	0.274803064928837	VWA_2 Alpha_kinase
FFUJ_14535	0.276187513191092	DUF3474 FA_desaturase
FFUJ_00577	0.278625653430943	
FFUJ_05118	0.281732909245252	Chitin_bind_1 Chitin_bind_1 Glyco_hydro_18 Chitin_bind_1 Chitin_bind_1 Glyco_hydro_18
FFUJ_06660	0.282897238685304	
FFUJ_08919	0.283354496185356	Glyco_transf_17
FFUJ_12698	0.283704315283559	Alpha_G G6B DUF4366 CbtA DUF1191 SKG6
FFUJ_00153	0.285161278615287	NACHT NACHT
FFUJ_14050	0.285372851911922	QLQ QLQ
FFUJ_09911	0.285469793013609	peroxidase
FFUJ_00467	0.286707192020084	Hemerythrin Hemerythrin
FFUJ_12277	0.287572973337651	Oxidored_molyb Mo-co_dimer Cyt-b5 FAD_binding_6 NAD_binding_1
FFUJ_00360	0.287844190491199	
FFUJ_14049	0.28798388725146	Peptidase_S10 Peptidase_S10
FFUJ_05603	0.290375170247149	
FFUJ_06236	0.291272216658977	
FFUJ_10564	0.292194312140311	
FFUJ_14341	0.293436450913128	His_Phos_1 His_Phos_1
FFUJ_01798	0.294136963332616	
FFUJ_03876	0.294702254015938	HET HET
FFUJ_10937	0.295495896254208	
FFUJ_03620	0.295508185838602	
FFUJ_02750	0.300198776044738	Homeobox
FFUJ_14774	0.300209180321791	Adaptin_N Adaptin_N Adaptin_N Adaptin_N
FFUJ_08768	0.300813245768533	McrBC Evr1_Alr
FFUJ_12655	0.300896660473004	Ank_2 Ank_2 BAR UPF0300 Ank_2
FFUJ_02076	0.300988443364097	
FFUJ_10764	0.304030928726338	
FFUJ_02565	0.30425861117266	NAP BUD22 PGBA_C
FFUJ_13836	0.304408384182801	Ammonium_transp
FFUJ_03426	0.304558230919548	Velvet
FFUJ_10195	0.304767295285258	FAD_binding_3 Phe_hydrox_dim
FFUJ_12847	0.304938454688496	NnrS p450
FFUJ_11612	0.305933500616175	p450 p450
FFUJ_07767	0.305992882322574	Acetyltransf_3 Acetyltransf_3
FFUJ_14797	0.306360032130758	adh_short
FFUJ_09375	0.306364279212047	HRXXH
FFUJ_09134	0.306617086549434	
FFUJ_00527	0.306776526065778	
FFUJ_12558	0.307193586220864	Cupin_3 Cupin_2
FFUJ_06904	0.307223397918858	Pkinase Pkinase
FFUJ_11733	0.307988844096523	DUF3761 Pex14_N SKG6
FFUJ_08448	0.308319918392508	Cwf_Cwc_15
FFUJ_07905	0.308916749225479	PBD PBD
FFUJ_11632	0.309070957539441	Pectinesterase
FFUJ_10770	0.313042404077906	
FFUJ_09948	0.314412395254878	Globin FAD_binding_6 NAD_binding_1
FFUJ_05842	0.314608597105831	
FFUJ_14922	0.315010102003432	
FFUJ_05117	0.315167352061362	LysM PBP1_TM LysM PBP1_TM
FFUJ_10851	0.316119075676662	
FFUJ_05494	0.316191392572367	
FFUJ_07810	0.316695879097683	POR_N Flavodoxin_1 NIR_SIR_ferr NIR_SIR NIR_SIR_ferr NIR_SIR POR_N Flavodoxin_1 NIR_SIR_ferr NIR_SIR NIR_SIR_ferr NIR_SIR
FFUJ_02889	0.317020930743987	F-box-like LRR_4
FFUJ_05467	0.317480524688774	
FFUJ_06921	0.317738100173992	Nucleos_tra2_N Nucleos_tra2_C Nucleos_tra2_N Nucleos_tra2_C

FFUJ_04670	0.318035562339397	
FFUJ_00263	0.320840906715162	DUF4123 Acetyltransf_7 DUF4123 Acetyltransf_7
FFUJ_12849	0.32243717671437	IBD TraF
FFUJ_12564	0.323657535797854	MFS_1
FFUJ_10742	0.32519342649888	
FFUJ_06099	0.326272658404755	
FFUJ_03900	0.32685212910713	PAN_3 PAN_3
FFUJ_11769	0.327219356991787	But2
FFUJ_01055	0.328207474534406	
FFUJ_06653	0.328644557798781	
FFUJ_04259	0.329835822667198	
FFUJ_05840	0.330485756515355	
FFUJ_08452	0.330866240319107	Flu_B_NS1
FFUJ_04182	0.33163311994795	DUF812 Spc7 DUF4407 Fib_alpha TMF_DNA_bd Fib_alpha DUF812 FAM184 Spc7 CENP-F_leu_zip Spc7 FAM184 FAM184 Spc7 DUF812 Spc7 DUF4407 Fib_alpha TMF_DNA_bd Fib_alpha DUF812 FAM184 Spc7 CENP-F_leu_zip Spc7 FAM184 FAM184 Spc7
FFUJ_14175	0.332842138888311	Amino_oxidase DUF4616 Amino_oxidase DUF4616
FFUJ_02785	0.333132958689387	Zn_clus Fungal_trans_2
FFUJ_02039	0.333340842678996	
FFUJ_12836	0.333502619908911	
FFUJ_08913	0.336712690122732	AA_permease
FFUJ_08222	0.337516514666331	
FFUJ_07919	0.341413024115547	Lectin_leg-like ATG16 IncA F_actin_bind Occludin_ELL Lectin_N DUF2353 FUSC PCRF SCAB_CC Lectin_leg-like ATG16 IncA F_actin_bind Occludin_ELL Lectin_N DUF2353 FUSC PCRF SCAB_CC
FFUJ_06421	0.343147321829514	
FFUJ_05290	0.343240096492186	CENP-F_N CENP-F_N
FFUJ_02481	0.343916443151416	Pro_isomerase
FFUJ_11142	0.344415028258759	
FFUJ_04020	0.345309037903797	
FFUJ_10634	0.345598772871458	
FFUJ_05835	0.346378190598861	
FFUJ_01179	0.347140116052704	
FFUJ_14072	0.348330812260727	Fringe PAN_4 Fringe PAN_4
FFUJ_03472	0.348504695701475	Aa_trans
FFUJ_05566	0.348959134019054	
FFUJ_11650	0.351315710731978	
FFUJ_14652	0.351610485657956	adh_short Thioredoxin GCN5L1
FFUJ_08026	0.351846971432265	PAN_1 PAN_1 PAN_1 PAN_1
FFUJ_00161	0.35184941025808	
FFUJ_07892	0.352188571581616	FA_hydroxylase FA_hydroxylase
FFUJ_12470	0.35229355818827	DUF2156
FFUJ_08055	0.353389235474718	Peptidase_S58 Peptidase_S58
FFUJ_10503	0.35590892096448	
FFUJ_08825	0.356812979231035	DUF3445
FFUJ_09647	0.357048014321664	DUF4140 DUF4139
FFUJ_04262	0.358066635422922	Acetyltransf_2 Acetyltransf_2 Acetyltransf_2 Acetyltransf_2
FFUJ_09069	0.358769710622917	
FFUJ_08881	0.35903838580581	CVNH
FFUJ_14648	0.359152882622987	Aldedh
FFUJ_01640	0.361390377963393	
FFUJ_02542	0.361761303337131	CENP-F_leu_zip Spc7 Prefoldin TFR_dimer
FFUJ_02283	0.361909278350957	HET Lbh
FFUJ_00517	0.363165736348647	
FFUJ_02287	0.36468935645359	Fer2 Fer2_2 FAD_binding_5 YjcZ CO_deh_flav_C Ald_Xan_dh_C Ald_Xan_dh_C2
FFUJ_02532	0.365106687666151	
FFUJ_05788	0.366191446964519	
FFUJ_01732	0.367276883385774	

FFUJ_12656	0.36764365718778	adh_short
FFUJ_08397	0.367666592707968	Ferric_reduct FAD_binding_8 NAD_binding_6
FFUJ_10478	0.368513659235738	
FFUJ_11757	0.368513659235738	DJ-1_PfpI
FFUJ_07060	0.368577523319954	ERGIC_N COPIIcoated_ERV ERGIC_N COPIIcoated_ERV
FFUJ_14661	0.369465100596429	PLAC8
FFUJ_00059	0.369813552232047	Ala_racemase_N SDH_alpha D-ser_dehydrat Ala_racemase_N SDH_alpha D-ser_dehydrat
FFUJ_09275	0.370028936514718	Sulfatase
FFUJ_12703	0.370090497918487	Ank_2 Ank_5 Ank_2 Ank
FFUJ_02502	0.370131544544182	RAMP4
FFUJ_11365	0.371347044176344	DAO
FFUJ_13231	0.372576865349656	CoA_binding Ligase_CoA Citrate_synt
FFUJ_14117	0.3731351044467	Adaptin_binding UPF0524 Adaptin_binding UPF0524
FFUJ_00675	0.374742107814802	
FFUJ_07765	0.375386845369542	VSP SKG6 VSP SKG6
FFUJ_11371	0.375730464343598	Abhydrolase_3
FFUJ_05519	0.376116108155415	
FFUJ_02075	0.376363858345886	
FFUJ_08200	0.378249478897475	Mpv17_PMP22
FFUJ_08167	0.378320274813145	Methyltransf_23
FFUJ_04023	0.378600966736379	Aa_trans Aa_trans
FFUJ_08727	0.379854811333853	CMAS
FFUJ_03656	0.380579563911311	Asp Asp
FFUJ_08826	0.380991310820793	EutQ
FFUJ_00380	0.381440516619642	Radical_SAM BATS Radical_SAM BATS
FFUJ_05126	0.38185054819358	Acetyltransf_1 Acetyltransf_1
FFUJ_08591	0.381951139320378	HLH
FFUJ_14739	0.382215979451701	Zip
FFUJ_09334	0.382629496790038	Sugar_tr
FFUJ_10156	0.383014257019367	
FFUJ_06112	0.383282491005747	
FFUJ_13981	0.383867413465085	
FFUJ_03086	0.384690471314733	polyprenyl_synt YkyB
FFUJ_06946	0.385010580964834	Aldo_ket_red TcpF Aldo_ket_red TcpF
FFUJ_13998	0.38580399829386	Amidohydro_3 Amidohydro_3
FFUJ_06119	0.386047426306431	
FFUJ_01709	0.386242814745415	
FFUJ_13230	0.386601730381314	ATP-grasp_2 Citrate_bind
FFUJ_12020	0.387191718288994	ketoacyl_synt Ketoacyl_synt_C KAsynt_C_assoc Collagen Acyl_transf_1 PS-DH Methyltransf_12 ADH_N KR PP-binding
FFUJ_08575	0.387210505404119	RRM RRM_6 RRM_1 RRM_6 RRM_1 DUF4523
FFUJ_04110	0.387339355895546	AA_permease AA_permease
FFUJ_09950	0.387817550898632	
FFUJ_11861	0.388180620509766	IDO IDO FAD_binding_1 NAD_binding_1 Cyt-b5
FFUJ_11062	0.389711929570895	
FFUJ_11202	0.389960526334173	DUF3129 Peptidase_S3
FFUJ_12687	0.390217395935291	Amidase
FFUJ_06404	0.390441957338422	
FFUJ_08999	0.39066664797163	
FFUJ_13515	0.391032384869388	ACT ALS_ss_C
FFUJ_00723	0.391157084526168	
FFUJ_03441	0.392515083551353	
FFUJ_00934	0.393024185678331	
FFUJ_13393	0.393258539822742	VWA
FFUJ_08904	0.393332144943106	
FFUJ_04751	0.394156371263677	HHH_6 CorA Reo_sigmaC ABC_tran_CTD HHH_6 CorA Reo_sigmaC ABC_tran_CTD
FFUJ_02113	0.394749679537069	ADH_N_2 ADH_zinc_N ADH_zinc_N_2
FFUJ_07522	0.396122896853803	LIM WRC LIM LIM WRC LIM
FFUJ_13987	0.396169576753761	CorA EMP70 CorA EMP70
FFUJ_03882	0.397151126348313	CYSTM CYSTM

FFUJ_05109	0.397286038507849	Fringe Fringe
FFUJ_13414	0.398057844783973	
FFUJ_04207	0.398491263469522	MFS_1 MFS_1
FFUJ_09094	0.398560322726816	FmdA_AmdA
FFUJ_14601	0.398717822587853	Ank_2 Ank_2 Ank_2
FFUJ_09184	0.399279248856691	Glyco_hydro_47
FFUJ_04911	0.399439801513298	DUF3060 DUF3060
FFUJ_05409	0.400379496353637	
FFUJ_00955	0.40040447410544	
FFUJ_10853	0.400476640808524	
FFUJ_12459	0.401496690248765	MFS_1
FFUJ_10467	0.402444013504955	
FFUJ_05331	0.402499807958901	
FFUJ_10043	0.403206275996924	His_Phos_1
FFUJ_04295	0.403396368071918	
FFUJ_08090	0.405001736816023	SNF2_N DZR Helicase_C
FFUJ_03578	0.405996726414661	
FFUJ_14773	0.407855496519105	GPDase_memb DUF3712
FFUJ_13228	0.408070408075455	Septin
FFUJ_07519	0.408568532875598	
FFUJ_06863	0.408579860957703	Zn_clus Fungal_trans Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_08455	0.41086034563563	DUF2638
FFUJ_05909	0.411552960431074	
FFUJ_01685	0.41204105582303	
FFUJ_12362	0.412372490962005	
FFUJ_02801	0.412501136697561	zf-H2C2_2 zf-H2C2_2
FFUJ_02790	0.412612662131025	EXS
FFUJ_06087	0.412641263252595	
FFUJ_14013	0.413835696735084	bPH_5 PA14_2 Filamin bPH_5 PA14_2 Filamin
FFUJ_01433	0.414869642783865	
FFUJ_11387	0.414961674021502	AA_permease
FFUJ_02037	0.41498756148526	
FFUJ_09706	0.415831224954864	adh_short
FFUJ_02040	0.416613068417192	
FFUJ_08095	0.417043564203546	Methyltransf_23
FFUJ_05289	0.417130294992023	DUF3474 FA_desaturase DUF3474 FA_desaturase
FFUJ_04815	0.417269101772181	FKBP_C FKBP_C
FFUJ_14592	0.41845082588423	Abhydrolase_6 Lipase3_N
FFUJ_01801	0.418912256445924	
FFUJ_10700	0.419141709864033	
FFUJ_14649	0.419598085366559	AA_permease_2
FFUJ_00057	0.419615536323229	Abhydrolase_3 Abhydrolase_3
FFUJ_05186	0.420084074786059	K_oxygenase K_oxygenase K_oxygenase K_oxygenase
FFUJ_14300	0.42011319380444	
FFUJ_07016	0.420121929903544	GHMP_kinases_N GHMP_kinases_C GHMP_kinases_N GHMP_kinases_C
FFUJ_12884	0.420165613124103	
FFUJ_05541	0.420401581014083	
FFUJ_07684	0.420614356966113	Kdo Kdo
FFUJ_14573	0.421078173278534	MFS_1 MFS_1
FFUJ_10479	0.42153957914673	
FFUJ_13218	0.422156548936767	Cyt-b5
FFUJ_08823	0.422270684845548	DUF4267 Nitrate_red_gam
FFUJ_09277	0.422967875610278	APH
FFUJ_09688	0.423927658215579	Abhydrolase_6
FFUJ_08464	0.4243274748306	Aminotran_1_2
FFUJ_12409	0.424568722926591	FAD_binding_4 BBE
FFUJ_02112	0.426465221857943	ADH_N PALP ADH_zinc_N
FFUJ_01039	0.426536172519163	
FFUJ_09940	0.426539129052863	Tropomyosin_1 Cnn_1N CENP-F_leu_zip
FFUJ_03496	0.427856822280198	ILVD_EDD
FFUJ_07070	0.428061502970305	DUF218 DUF218
FFUJ_07400	0.428916880182363	

FFUJ_10509	0.429720348613106	
FFUJ_09144	0.430516369711556	
FFUJ_08773	0.430516369711556	
FFUJ_10768	0.430799953717358	
FFUJ_10047	0.43129891743223	ABC_trans_N ABC_tran ABC2_membrane PDR_CDR ABC_tran  ABC2_membrane PDR_CDR
FFUJ_11639	0.432097862697733	MFS_1
FFUJ_03123	0.43234053182091	Aminotran_3 DNA_ligase_IV
FFUJ_02180	0.432343528587502	Methyltransf_23
FFUJ_01746	0.433294551337131	
FFUJ_08031	0.433468781757343	DUF3262 p450 Pardaxin DUF3262 p450 Pardaxin
FFUJ_00924	0.433531882459156	
FFUJ_02116	0.433664123240727	FMN_dh SPOR
FFUJ_00358	0.433745290963119	
FFUJ_10769	0.434437335907575	
FFUJ_09687	0.434762677003059	
FFUJ_12688	0.434807882531641	Peptidase_S8 PA fn3_5 FlgD_ig
FFUJ_07332	0.435770367119926	PALP DUF3343 PALP DUF3343
FFUJ_06575	0.436078570119776	
FFUJ_09408	0.436429340411835	
FFUJ_06887	0.436456567140086	Asparaginase TPP_enzyme_M Asparaginase TPP_enzyme_M
FFUJ_09604	0.436604831350131	
FFUJ_12208	0.436710765192221	Glyco_hydro_47
FFUJ_14750	0.437049926240648	Abhydrolase_6
FFUJ_07466	0.437662293492604	Aldo_ket_red Aldo_ket_red
FFUJ_06770	0.437792759620019	AAA_22 TPR_12 TPR_12 AAA_22 TPR_12 TPR_12
FFUJ_00500	0.437798828758427	
FFUJ_09258	0.437905052301234	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_04639	0.439148262249399	SIP1 PNISR FliL SIP1 PNISR FliL
FFUJ_00440	0.439385754060422	
FFUJ_12422	0.439461900406961	
FFUJ_08849	0.439949549610684	DUF4821 Acetyltransf_7
FFUJ_08471	0.440562925874996	Coprogen_oxidas DUF1651
FFUJ_01010	0.441351498145327	
FFUJ_03302	0.442221171048835	
FFUJ_10779	0.44264437703785	
FFUJ_09124	0.443867197429088	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_03047	0.443965661243531	bZIP_2 DUF3425
FFUJ_11582	0.444011823675245	COesterase YppG
FFUJ_06474	0.444014901341349	
FFUJ_05200	0.445034781869514	DUF1446 DUF1446
FFUJ_09442	0.44516127443041	
FFUJ_10678	0.445189045902042	
FFUJ_05076	0.446483881898375	PALP DUF212 PALP DUF212
FFUJ_02077	0.44702579883343	
FFUJ_10201	0.447785587738258	Rota_NSP3 BIR
FFUJ_04912	0.448046383961174	Kelch_5 Kelch_5
FFUJ_05561	0.448282473327423	
FFUJ_02054	0.448478273287004	
FFUJ_13770	0.44883590647449	NmrA Ish1
FFUJ_11548	0.448876352511345	AATase
FFUJ_13592	0.449629936827063	MFS_1
FFUJ_01963	0.449689156073876	
FFUJ_08586	0.450962695179461	Zip DUF2201_N DUF4512
FFUJ_02295	0.451194066318181	FMN_bind_2
FFUJ_00023	0.451550735257589	
FFUJ_12901	0.451785539624313	PNP_UDP_1 NACHT Ank_2 Ank_4 Ank_2 Ank_3
FFUJ_08947	0.451863834876136	Plug_translocon SecY
FFUJ_09867	0.452011066684639	DZR
FFUJ_07425	0.452264919199746	adh_short adh_short
FFUJ_05981	0.452396602551281	
FFUJ_01008	0.453055594654431	
FFUJ_10225	0.453567759688791	

FFUJ_02208	0.453825632122038	
FFUJ_03473	0.453835069258879	DAO
FFUJ_14540	0.453926305032967	Pro_racemase
FFUJ_08129	0.45410568397735	AIM24
FFUJ_09641	0.454241051841812	
FFUJ_11252	0.454789231622246	Amidohydro_1 Ntox43
FFUJ_08935	0.454849130382425	Arf
FFUJ_11859	0.455057261065231	Methyltransf_23
FFUJ_04739	0.455578004528632	zf-C2H2 zf-C2H2 Fungal_trans zf-C2H2 zf-C2H2 Fungal_trans
FFUJ_01774	0.456583300760403	
FFUJ_13324	0.457169163253472	2-Hacid_dh 2-Hacid_dh_C
FFUJ_12634	0.45733080343554	OppC_N p450
FFUJ_13253	0.457406889177675	Ferric_reduct FAD_binding_8 NAD_binding_6
FFUJ_14918	0.457777988480655	
FFUJ_00961	0.45778750780529	
FFUJ_03540	0.458025555265899	Ank_2 Ank_5 CorA
FFUJ_10332	0.458282785559044	
FFUJ_10075	0.458851745232775	RTA1 DUF2723
FFUJ_08386	0.458975802199484	Wbp11 FAM76 V_ATPase_I Allexi_40kDa XhlA DUF4472 Jnk-SapK_ap_N DUF1395 Spc24 DUF972 Filament PspA_IM30 Atg14 DUF724 LMBR1 SlyX DUF4446 Tropomyosin DUF4407 DUF3552 CENP-Q DivIC Cytadhesin_P30 GreA_GreB_N PKcGMP_CC
FFUJ_06760	0.45945325704119	Acetyltransf_3 Acetyltransf_3
FFUJ_07985	0.460055557375441	
FFUJ_06285	0.460323499790251	
FFUJ_00888	0.460336262844624	
FFUJ_02768	0.461077125792227	
FFUJ_12388	0.461652754571048	Transp_cyt_pur
FFUJ_07331	0.461665554480701	MFS_1 MFS_1
FFUJ_00261	0.461835186791583	GMC_oxred_N GMC_oxred_C GMC_oxred_N GMC_oxred_C
FFUJ_08181	0.462575255761657	Methyltransf_23
FFUJ_09994	0.463056454976209	
FFUJ_00404	0.463085342842118	
FFUJ_01429	0.46319128043658	
FFUJ_12584	0.463538154763763	HET
FFUJ_02568	0.465228053555468	Septin Casc1_N FOXp-CC
FFUJ_10557	0.465240952594831	
FFUJ_06249	0.465615180351024	
FFUJ_11728	0.46574429418897	OCD_Mu_crystall
FFUJ_13640	0.465747522493602	Cyt-b5 FA_desaturase
FFUJ_03937	0.465776578242275	Nramp Nramp
FFUJ_14866	0.466022010191079	DUF4267
FFUJ_02732	0.466303123946631	PMM
FFUJ_02504	0.466623218289647	bZIP_2
FFUJ_00833	0.466852916189521	
FFUJ_10329	0.467367720295572	
FFUJ_12650	0.46745519622762	Sugar_tr
FFUJ_04469	0.468233480009513	ADH_N Glu_dehyd_C ADH_zinc_N ADH_N Glu_dehyd_C ADH_zinc_N
FFUJ_07262	0.468321117983428	Uds1 Uds1
FFUJ_01324	0.468350334286349	
FFUJ_00958	0.468379552411936	
FFUJ_00502	0.468412019133752	
FFUJ_11438	0.468967548482483	peroxidase peroxidase peroxidase
FFUJ_04667	0.468980551204098	FA_hydroxylase FA_hydroxylase
FFUJ_02150	0.469152871304412	Peptidase_M24 DUF1031
FFUJ_02325	0.47027612618676	NmrA
FFUJ_03824	0.470367406804266	
FFUJ_12137	0.470536974959473	
FFUJ_08395	0.470928519428717	MFS_1
FFUJ_12196	0.471055841519706	CMD



FFUJ_10163	0.471568742863888	NAD_binding_8
FFUJ_14591	0.471954603165161	
FFUJ_09095	0.472085474908013	Abhydrolase_1
FFUJ_04216	0.472537261057993	Peptidase_C14 Peptidase_C14
FFUJ_08091	0.472917357775483	KinB_sensor DUF4047 NACHT Toxin_trans DUF1548 DUF413 ESCRT-II
FFUJ_00880	0.473465102963539	
FFUJ_02276	0.47373757156428	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_01913	0.473931349403578	
FFUJ_06471	0.47401019696462	
FFUJ_00676	0.474075913285939	
FFUJ_08454	0.474417785052181	PRMT5
FFUJ_13235	0.474509869565862	
FFUJ_13787	0.475148374816199	Sod_Fe_N Sod_Fe_C
FFUJ_12607	0.475197779547964	Acetyltransf_3
FFUJ_13418	0.475580016317526	uDENN DENN
FFUJ_10294	0.475669029322455	
FFUJ_05491	0.475797633076388	
FFUJ_00589	0.47603514674623	
FFUJ_04313	0.476163849485112	Prok-TraM Rsm22 Prok-TraM Rsm22
FFUJ_13535	0.476272778980645	Sec34
FFUJ_12289	0.476708746212057	p450
FFUJ_11416	0.477717621703909	MFS_1
FFUJ_14539	0.478098571430896	PC-Esterase Cas1_AcylT
FFUJ_05419	0.478098571430896	
FFUJ_12411	0.478675542554158	VIT1
FFUJ_09628	0.478848105804756	AA_permease
FFUJ_03010	0.479150241197947	
FFUJ_04074	0.479239922432058	MBOAT MBOAT
FFUJ_10891	0.479326298003324	
FFUJ_05362	0.479542305047008	
FFUJ_04021	0.480570501357928	MFS_1 Pox_A14 MFS_1 Pox_A14
FFUJ_07224	0.481233839860283	Gln-synt_N Gln-synt_C Gln-synt_C Gln-synt_N Gln-synt_C Gln-synt_C
FFUJ_03277	0.481237175530636	Ribosomal_L10
FFUJ_11841	0.481327247370512	MatE MatE
FFUJ_07843	0.481747805581081	Prok-RING_2 Prok-RING_2
FFUJ_11410	0.482299092292069	SGL
FFUJ_05015	0.482549885667198	MOSC_N MOSC_N
FFUJ_05876	0.482988250961397	
FFUJ_11233	0.483923196331255	adh_short
FFUJ_14542	0.484403099030631	DAO
FFUJ_14915	0.484789380004878	SWIM
FFUJ_00597	0.485007848971051	
FFUJ_13315	0.485323962856869	Glyco_hydro_16
FFUJ_00241	0.485633550419252	Peptidase_C65 Peptidase_C65
FFUJ_04441	0.485892813555709	MTHFR MTHFR
FFUJ_11414	0.486256688589423	HET HET
FFUJ_11417	0.486593852880887	
FFUJ_02707	0.486755774771418	DUF3593 Ctr
FFUJ_08729	0.487062899610414	
FFUJ_10969	0.48735670564941	
FFUJ_04009	0.487616888719486	Thioredoxin Thioredoxin_6 Trypan_PARP Thioredoxin Thioredoxin_6 Trypan_PARP
FFUJ_11334	0.487846776277535	Zn_clus
FFUJ_00915	0.488229035029082	
FFUJ_03593	0.488286568897215	
FFUJ_08380	0.489224988350048	MFS_1
FFUJ_03884	0.489262291313481	
FFUJ_10971	0.489282639583275	
FFUJ_14831	0.489289422527933	Aa_trans
FFUJ_08468	0.489381001484755	Baculo_PEP_C
FFUJ_13255	0.490318125648061	SAM_1

FFUJ_06419	0.490382703799384	
FFUJ_13719	0.490423494382417	Gin
FFUJ_13348	0.490647903246657	Zn_clus Fungal_trans_2
FFUJ_12410	0.49109702907836	CFEM
FFUJ_00614	0.493191554466451	
FFUJ_13494	0.493492478049427	DJ-1_PfpI
FFUJ_04783	0.493752514354956	NUDIX NUDIX
FFUJ_13982	0.493892853992517	AA_permease_2 AA_permease_2
FFUJ_02650	0.493961326826431	DUF258 MMR_HSR1
FFUJ_05801	0.494392924025292	
FFUJ_03881	0.494653434803392	AAA_18 SMP_LBD AAA_18 SMP_LBD
FFUJ_14038	0.495044458376476	Aldo_ket_red TRI9 Aldo_ket_red TRI9
FFUJ_00267	0.495422054847277	MFS_1 MFS_1
FFUJ_10199	0.496143720792666	zf-C2H2 FOX-CC zf-C2H2 Fungal_trans
FFUJ_05777	0.496209066213533	
FFUJ_11995	0.496332902192948	DUF4699 zf-C2H2_4 HTH_Tnp_Tc5
FFUJ_08305	0.496659839987925	Aminotran_5
FFUJ_06333	0.497814445523095	
FFUJ_04235	0.498104379211586	Methyltransf_24 Methyltransf_24
FFUJ_02521	0.498995946064145	Mannosyl_trans3
FFUJ_04426	0.49906166714201	Asp Rax2 SKG6 Asp Rax2 SKG6
FFUJ_02685	0.499456175423051	NDT80_PhoG
FFUJ_04531	0.499615451268382	Bul1_N Bul1_C Bul1_N Bul1_C
FFUJ_13024	0.499657009841699	DUF1688

#### X.Anexo 1.C. Genes activados por *carS* en la oscuridad

FFUJ_05174	Inf	
tRNA-Gly(CCC)	Inf	
FFUJ_14350	Inf	Pectate_lyase Pectate_lyase
FFUJ_08998	Inf	
FFUJ_11804	416.998967124349	Bac_rhodopsin
FFUJ_11472	365.173939149479	Oxidored_molyb SLBB Mo-co_dimer Catalase Catalase Catalase-rel
FFUJ_10321	334.249131162832	
FFUJ_06628	259.92831670898	
FFUJ_09119	235.89319657416	NAD_binding_8 Pyr_redox DUF3452
FFUJ_13896	216.843441671704	Fasciclin Fasciclin Fasciclin Fasciclin
FFUJ_11802	208.849517462977	SQS_PSY
FFUJ_09358	191.862639565526	Sterol-sensing Amidase Orn_DAP_Arg_deC Amidase
FFUJ_10896	172.057861312718	
FFUJ_12435	171.354468020785	
FFUJ_09337	170.01049516601	
FFUJ_11803	160.763936627628	Amino_oxidase Amino_oxidase
FFUJ_02301	139.210092717867	Alba Vps16_C ATP-grasp_4
FFUJ_05128	133.832064594971	Catalase Catalase-rel Catalase Catalase-rel
FFUJ_08281	132.334003266526	
FFUJ_09320	125.477945287252	Ferritin_2
FFUJ_11801	114.715776175165	RPE65 PPI_Ypi1
FFUJ_10692	98.1978818151315	
FFUJ_10705	90.6767010763235	
FFUJ_03418	80.8961983009796	CHZ
FFUJ_03408	78.8445975777106	Abhydrolase_5
FFUJ_10505	71.5812583269055	
FFUJ_09378	71.5167861273308	DUF1772
FFUJ_09284	63.5557169964982	DUF4385
FFUJ_04654	56.7016966666149	FAD_binding_3 FAD_binding_3
FFUJ_10895	56.3928362772902	
FFUJ_05402	44.9562564229818	
FFUJ_04228	43.6373019820858	
FFUJ_11471	42.9319560288214	
FFUJ_10073	39.9025765325593	Glyco_hydro_76

FFUJ_09847	39.080851602607	Ferritin_2
FFUJ_11042	38.8316202536556	
FFUJ_11537	37.994007861019	NmrA
FFUJ_10466	36.7025908004388	
FFUJ_01993	35.5766804904228	
FFUJ_07962	35.1044008578873	RPE65 RPE65
FFUJ_13902	34.0695266933515	Dak1 Dak2 Dak1 Dak2
FFUJ_13161	31.8278985394897	RTA1
FFUJ_05934	30.4922351092074	
FFUJ_08272	27.1343792578889	DUF3140 KIND
FFUJ_03586	26.8647033081469	DUF150 YPEB DUF1409
FFUJ_04061	25.7642733769161	FAD_binding_3 FAD_binding_3
FFUJ_03407	25.7294729557544	Catalase Catalase
FFUJ_02302	25.5248397766514	DHQ_synthase
FFUJ_10167	24.5137620167689	DUF3123
FFUJ_11824	24.5129124492395	Abhydrolase_3
FFUJ_09338	24.4508039990793	Abhydrolase_1
FFUJ_01785	24.0297544311142	
FFUJ_10046	23.3953515112415	Zn_clus
FFUJ_11615	23.3367216513974	
FFUJ_01088	23.0253311472282	
FFUJ_00756	22.6817492149354	
FFUJ_10322	21.9950961074939	
FFUJ_14904	21.6334222185166	Arylesterase
FFUJ_08014	21.3052931900173	ADH_N ADH_zinc_N ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_03267	20.8962187547248	DUF1295
FFUJ_05082	20.427347832193	
FFUJ_06546	19.4004740508014	
FFUJ_07351	19.0813322756119	MFS_1 MFS_1 OAD_gamma MFS_1 MFS_1 OAD_gamma
FFUJ_06163	18.6021826255336	
FFUJ_08084	18.3093668812492	FAD_binding_3
FFUJ_03574	17.8571507465893	BTB Viral_env_E26
FFUJ_06988	17.4541718295228	Aldo_ket_red Aldo_ket_red
FFUJ_03105	17.0098675245173	DNA_photolyase FAD_binding_7
FFUJ_00337	16.8305451273067	Methyltransf_24 Methyltransf_24
FFUJ_05515	16.6647757638407	
FFUJ_02581	16.5152854471329	
FFUJ_10993	16.425438719664	
FFUJ_10970	16.1442666141748	
FFUJ_10506	16.0821679898818	
FFUJ_09445	15.8825427803953	
FFUJ_06160	15.7866155091831	
FFUJ_00034	15.7058487089693	
FFUJ_00345	15.560969039472	AhpC-TSA_2 AhpC-TSA_2
FFUJ_05300	15.5129375743339	adh_short Prp19 adh_short Prp19
FFUJ_13453	15.4747049789529	zf-rbx1
FFUJ_09310	15.065952700477	NmrA
FFUJ_10453	14.858947249345	
FFUJ_11045	14.8511217383158	
FFUJ_12719	14.686920261287	Polyketide_cyc2
FFUJ_06571	14.388257709923	
FFUJ_14379	14.3568764636761	DUF4131 DUF4131
FFUJ_06982	14.1034870093144	Alpha_GJ Podoplanin SKG6 Alpha_GJ Podoplanin SKG6
FFUJ_09359	13.7246742243329	F-box
FFUJ_10047	13.6446170559604	ABC_trans_N ABC_tran ABC2_membrane PDR_CDR ABC_tran ABC2_membrane PDR_CDR
FFUJ_06705	13.5948657534631	DUF1399 DUF1399
FFUJ_08275	13.4525708511954	Sugar_tr Phage_holin_3_2
FFUJ_06207	12.88838865678	
FFUJ_05732	12.614752535258	
FFUJ_14669	12.1939193152627	
FFUJ_07352	11.9373442094803	polyprenyl_synt polyprenyl_synt
FFUJ_01857	10.9985390779219	

FFUJ_10900	10.7764492850329	
FFUJ_00239	10.7309805190665	Gln-synt_N_2 Gln-synt_C GST_N Gln-synt_N_2 Gln-synt_C GST_N
FFUJ_07759	10.6027750226347	NmrA NmrA
FFUJ_11381	10.3760828562184	
FFUJ_05524	10.30483857382	
FFUJ_03411	10.2967704040769	Fasciclin Fasciclin
FFUJ_01451	10.2615730427081	
FFUJ_03572	10.2524016569164	
FFUJ_05731	10.1849712303971	
FFUJ_08327	10.0811617566992	DUF4072 UBA2_C
FFUJ_14331	9.95202424397322	
FFUJ_14760	9.92598311168617	His_Phos_2
FFUJ_05866	9.88869402190253	
FFUJ_09120	9.59484832146063	Sugar_tr
FFUJ_12794	9.53808738290041	SnoaL
FFUJ_10166	9.25106845653974	Isochorismatase
FFUJ_14378	9.22782087787826	
FFUJ_03573	9.11024593042187	ERAP1_C
FFUJ_13751	9.06043300867488	DUF4692 SR-25
FFUJ_02978	9.04085991446287	
FFUJ_11664	8.7592053984718	MFS_1
FFUJ_08266	8.73192658075204	RTA1
FFUJ_11427	8.70002773399697	GATA
FFUJ_12693	8.62497335566336	adh_short adh_short
FFUJ_11805	8.54174009001888	Ammonium_transp
FFUJ_09747	8.46746430510309	zf-C2H2 zf-C2H2 zf-C2H2
FFUJ_07916	8.46083470689854	GST_N GST_C_3 GST_N GST_C_3
FFUJ_10890	8.45561681921124	
FFUJ_07515	8.45380010844464	SIS SIS
FFUJ_04508	8.38290337267412	DNA_pol3_alpha Pyrid_ox_like DNA_pol3_alpha Pyrid_ox_like
FFUJ_00275	8.35366911416667	GFA GFA
FFUJ_14761	8.18186651370776	Pyr_redox_2
FFUJ_05953	8.17347738566538	
FFUJ_10298	8.11668148301595	
FFUJ_00322	8.11392518422616	adh_short Wax2_C adh_short Wax2_C
FFUJ_10474	8.05212740767626	
FFUJ_13149	7.83438485099645	DUF1772 Trp_oprn_chp TMEM237
FFUJ_08747	7.75835074650562	Mito_carr Mito_carr Mito_carr
FFUJ_10432	7.71368375670417	
FFUJ_11972	7.66890182076041	ABC_trans_N DUF4209 ABC_tran ABC2_membrane PDR_CDR ABC_tran ABC2_membrane PDR_CDR
FFUJ_10691	7.65238786904756	
FFUJ_01296	7.64544248010102	
FFUJ_01396	7.54682593857735	
FFUJ_09299	7.52311424967062	Amino_oxidase
FFUJ_06907	7.51659879089666	AP_endonuc_2 AP_endonuc_2
FFUJ_08714	7.40905734503377	zf-C3HC4_4 zf-C3HC4_3 zinc_ribbon_2 AroM LON_substr_bdg DUF2414
FFUJ_11815	7.39233429724662	GST_N GST_C Heme_oxygenase
FFUJ_14206	7.29313955259997	
FFUJ_11854	7.16750000265398	Reticulon
FFUJ_08013	7.14161321183032	Rieske Pyr_redox_2 Reductase_C Rieske Pyr_redox_2 Reductase_C
FFUJ_01329	7.14067273783907	
FFUJ_00279	7.13735731784584	
FFUJ_04367	7.11029787203374	SelR SelR
FFUJ_08865	7.02422958630467	
FFUJ_03526	7.02262305782118	WSC
FFUJ_13702	6.96609428640406	Exo_endo_phos
FFUJ_12722	6.93569280368818	Glyco_hydro_43
FFUJ_02192	6.81474653973821	p450 Flavodoxin_1 FAD_binding_1 NAD_binding_1
FFUJ_13183	6.78002221305252	Cytochrom_B561 DUF2306

FFUJ_07428	6.71990109847675	DUF3188 RTA1 DUF3188 RTA1
FFUJ_13447	6.71384858117167	Collagen
FFUJ_00295	6.70333948605053	KGG KGG KGG KGG KGG KGG
FFUJ_02297	6.63336080599937	Sugar_tr
FFUJ_12437	6.52487380789924	CLP_protease Amidohydro_1
FFUJ_08309	6.50658256748994	AA_permease SVM_signal
FFUJ_04190	6.48474569934791	adh_short FlgD_ig adh_short FlgD_ig
FFUJ_04335	6.47657016984067	
FFUJ_06138	6.34882670833358	
FFUJ_05190	6.31516312369683	
FFUJ_03410	6.22800455686992	Zn_clus
FFUJ_07503	6.16897158045576	Aldedh Aldedh
FFUJ_07487	6.12742109028542	Mucin Mucin
FFUJ_13534	6.12725120445444	RCC1_2 RCC1_2 RCC1 RCC1
FFUJ_08029	6.09657932135908	ABC_trans_N ABC_tran ABC2_membrane PDR_CDR ABC_tran ABC2_membrane PDR_CDR ABC_trans_N ABC_tran ABC2_membrane PDR_CDR ABC_tran ABC2_membrane PDR_CDR
FFUJ_14044	6.07540253571156	Amidohydro_1 Amidohydro_1
FFUJ_10815	6.04025727448289	
FFUJ_08028	6.02942322320831	Zn_clus Zn_clus
FFUJ_11542	5.97198275715596	Metallophos
FFUJ_12960	5.95425083773719	Peptidase_S10
FFUJ_03089	5.94633193772406	
FFUJ_09413	5.93850589411239	CsbD CsbD
FFUJ_02772	5.90149306752074	Helicase_C
FFUJ_12444	5.86682516723697	
FFUJ_12699	5.8520414981924	F-box-like
FFUJ_10331	5.84073528442866	
FFUJ_12948	5.82973376798897	DLH DLH
FFUJ_04053	5.81843032259975	
FFUJ_03236	5.80996712364455	Ubiq_cyt_C_chap
FFUJ_14670	5.79219430542898	Lipase_GDSL_2 Lipase_GDSL_2 VCBS VCBS VCBS VCBS
FFUJ_11951	5.79115054026505	
FFUJ_14520	5.76951481052287	HRXXH Defensin_2
FFUJ_11562	5.6641520734424	His_Phos_2
FFUJ_07699	5.65701109296964	DUF445 SPG48 DUF4449 DUF445 SPG48 DUF4449
FFUJ_02209	5.65465889735518	
FFUJ_11705	5.64443822195176	PBP
FFUJ_12419	5.61299198802138	CN_hydrolase
FFUJ_12918	5.5760751312236	CFEM
FFUJ_13152	5.56121456171449	L-fibroin DUF1074 Phasin_2 Apolipoprotein
FFUJ_05077	5.52276216575092	SnoL_3 SnoL_3
FFUJ_01996	5.46764660865436	
FFUJ_05984	5.42062798921327	
FFUJ_08020	5.41206812683625	
FFUJ_02466	5.38389397783254	
FFUJ_05604	5.33415593408503	
FFUJ_06191	5.2185536081711	
FFUJ_01016	5.10665997163327	
FFUJ_07049	5.06060545336075	CTP_transf_like CTP_transf_like
FFUJ_06448	5.05303439455358	
FFUJ_03785	5.04942811060465	Aminotran_5 Aminotran_5
FFUJ_09693	5.04781836869472	
FFUJ_09699	5.03223745523203	Cation_ATPase_N E1-E2_ATPase E1-E2_ATPase Hydrolase Cation_ATPase Hydrolase Cation_ATPase_C
FFUJ_11846	5.02603249931949	Thioredoxin
FFUJ_03248	4.98374412663163	
FFUJ_12919	4.98374412663163	
FFUJ_05084	4.96701808616138	
FFUJ_14823	4.96192524449208	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_12370	4.9179259083887	
FFUJ_05893	4.89039161977308	

FFUJ_14547	4.88453084761995	Glyco_hydro_18
FFUJ_08282	4.87820369235972	
FFUJ_01292	4.83246740001215	
FFUJ_07815	4.81421308738852	GATase GATase
FFUJ_10029	4.79390061503396	Acyl_transf_3 DUF1772
FFUJ_03265	4.7800310842692	
FFUJ_14513	4.75837838811499	Oxidored_molyb Mo-co_dimer Cyt-b5 FAD_binding_6 NAD_binding_1
FFUJ_04548	4.74813185832894	Pyridox_oxase_2 Pyridox_oxase_2
FFUJ_11052	4.71772066659524	
FFUJ_09086	4.59705523285463	PX DUF3782 RPN7
FFUJ_09929	4.58302450599357	p450
FFUJ_00241	4.57163429281702	Peptidase_C65 Peptidase_C65
FFUJ_02346	4.55206134504944	MFS_1 DUF1049
FFUJ_14336	4.55143033909103	Prenyltrans Prenyltrans
FFUJ_00702	4.53788484774953	
FFUJ_10756	4.50185627983576	
FFUJ_04063	4.48786724372745	MFS_1 MFS_1
FFUJ_10316	4.47879303250251	
FFUJ_10711	4.47658940622566	
FFUJ_12376	4.47531738349907	adh_short adh_short
FFUJ_00233	4.46218398473802	GST_N_3 GST_C_2 GST_N_3 GST_C_2
carS	4.45668192821837	
FFUJ_10706	4.44566734447564	
FFUJ_13851	4.44261770418317	Abhydrolase_1 SPARC_Ca_bdg NGF Abhydrolase_4
FFUJ_01726	4.41896958098825	
FFUJ_07367	4.36953573222265	Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr
FFUJ_09771	4.34422853382942	Zn_clus Fungal_trans_2
FFUJ_04133	4.33923283346627	CIA30 CIA30
FFUJ_10693	4.32544930460567	
FFUJ_10464	4.3163743735296	
FFUJ_09681	4.30776634608088	
FFUJ_13474	4.30266345433397	Aldo_ket_red
FFUJ_02539	4.27243931425247	ABC1
FFUJ_10344	4.2553564961737	
FFUJ_04935	4.23596303572914	
FFUJ_10818	4.22239047118335	
FFUJ_11468	4.2057409765229	Aa_trans
FFUJ_12796	4.20416706444849	adh_short adh_short
FFUJ_12385	4.1645482283043	
FFUJ_10992	4.15074412810672	
FFUJ_11440	4.13753065242075	ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_08086	4.13008078141517	HSP20 HSP20
FFUJ_12710	4.12564589574771	adh_short
FFUJ_03481	4.0873336055242	Oxidored_FMN
FFUJ_03512	4.08150153531737	Asp
FFUJ_11486	4.07234559700183	HD
FFUJ_09806	4.06011333579938	
FFUJ_00148	4.0422260427369	Semialdhyde_dh Epimerase PARG_cat Semialdhyde_dh Epimerase PARG_cat
FFUJ_06257	4.01299678414414	
FFUJ_10899	4.00041590992947	
FFUJ_00741	3.97143392345491	
FFUJ_06681	3.96516252318692	
FFUJ_09580	3.96008116558895	AAR2
FFUJ_06265	3.95857174782352	
FFUJ_02467	3.95399213126283	HTH_31 Cyanate_lyase
FFUJ_01836	3.95253982784026	
FFUJ_06543	3.93900159190033	
FFUJ_09007	3.93621766214495	ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_10726	3.91534653075239	
FFUJ_05659	3.9142611166662	
FFUJ_03926	3.90548034492693	Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr

FFUJ_10885	3.90350468174577	
FFUJ_09845	3.89345243107347	C2 C2
FFUJ_05836	3.88167680011945	
FFUJ_03310	3.87240541215259	
FFUJ_08504	3.85924865215231	ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_07015	3.84749646223766	MCU Glyco_trans_4_4 DUF1281 MCU Glyco_trans_4_4 DUF1281
FFUJ_09319	3.80661852642512	Hemerythrin DUF1722 CTK3_C Hemerythrin
FFUJ_00903	3.79452684148128	
FFUJ_08269	3.77922391689148	adh_short
FFUJ_09682	3.7760555800648	adh_short adh_short
FFUJ_13754	3.76849897428432	PAP2
FFUJ_01887	3.75598161182295	
FFUJ_00436	3.74384316601926	DNA_photolyase Usp FAD_binding_7 DNA_photolyase Usp FAD_binding_7
FFUJ_03887	3.73298574631717	Pro_dh Pro_dh
FFUJ_14861	3.73096803514374	RTA1
FFUJ_10429	3.72159225619583	
FFUJ_10702	3.71684879715044	
FFUJ_04032	3.6975508810048	HET HET
FFUJ_01375	3.68626554205663	
FFUJ_01212	3.66954197511942	
FFUJ_04828	3.65905220685803	Zn_clus Fungal_trans Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_08523	3.65745471079883	
FFUJ_09169	3.65188162142132	2_5_RNA_ligase2 Sacchrp_dh_NADP FliD_C TACC DUF2207 DUF4391 IncA TBPIP DUF3373 FlxA Lzipper-MIP1 DivIC ArsP_1 IncA
FFUJ_03404	3.64892121100758	ADH_N ADH_zinc_N NMO RYDR_ITPR
FFUJ_05585	3.63362616563666	
FFUJ_13018	3.63294619707899	GIY-YIG zf-HC5HC2H_2
FFUJ_07050	3.61631412385502	
FFUJ_06202	3.591558463631	
FFUJ_00413	3.58887083282261	PMSR PMSR
FFUJ_04803	3.58775158032357	MFS_1 MFS_1
FFUJ_14332	3.58742830570277	p450 p450
FFUJ_07365	3.55081451544667	
FFUJ_02580	3.51964518919006	MFS_1
FFUJ_14043	3.50652010529736	FAD_binding_4 BBE zf-RING_2 FAD_binding_4 BBE zf-RING_2
FFUJ_13276	3.50608263637424	Apolipoprotein DUF883 YtxH
FFUJ_13562	3.48889456573462	Cellulase EKLF_TAD1
FFUJ_02208	3.48452015581683	
FFUJ_09141	3.48017535323045	Histone
FFUJ_11236	3.4759082468501	Zn_clus DUF3425
FFUJ_00230	3.44570692932791	FAM76 Borrelia_P83 FAM76 Borrelia_P83
FFUJ_04031	3.42219033094253	Pkinase Pkinase
FFUJ_08978	3.39603187494296	
FFUJ_03315	3.39579648810902	DUF2236
FFUJ_08614	3.37814206318676	Fungal_trans_2
FFUJ_11749	3.37697149121983	Aa_trans
FFUJ_04144	3.37619913592849	ABC_membrane BCS1_N AAA AAA ABC_membrane BCS1_N AAA AAA
FFUJ_06923	3.36262989826439	DUF3429 DUF3429
FFUJ_08940	3.36244343963951	Pept_tRNA_hydro Helicase_C SUV3_C
FFUJ_14335	3.35983410424372	polyprenyl_synt Phasin polyprenyl_synt Phasin
FFUJ_11380	3.35878628087735	Polyketide_cyc2 DUF4520
FFUJ_12314	3.34783865352399	ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_11509	3.31865808739279	Metallophos
FFUJ_03673	3.31523238215334	Glucosamine_iso
FFUJ_02154	3.29692255871749	p450
FFUJ_06164	3.27231129863139	
FFUJ_04725	3.26605706933127	MoCF_biosynth MoCF_biosynth
FFUJ_03511	3.26304752530092	YL1 RIO1

FFUJ_09742	3.26275350816295	Tannase
FFUJ_06185	3.2622333888929	
FFUJ_08144	3.25624668801108	E1-E2_ATPase
FFUJ_09098	3.25358444821168	Arrestin_N Bul1_C
FFUJ_06958	3.25238940490535	DUF3292 Pex24p DUF3292 Pex24p
FFUJ_05780	3.25011327334232	
FFUJ_02368	3.24878438904637	ProQ TBPIP
FFUJ_05834	3.2476586412651	
FFUJ_05502	3.24466605066765	
FFUJ_08602	3.23981177824795	PBP
FFUJ_00722	3.23929531614531	
FFUJ_10898	3.23799329900388	
FFUJ_06223	3.23182706147624	
FFUJ_14337	3.23095352814342	p450 p450
FFUJ_06003	3.22891620178798	
FFUJ_01274	3.22723805240632	
FFUJ_00247	3.20467932201502	NUDIX DUF2163 NUDIX DUF2163
FFUJ_11473	3.19757899324535	Mo-co_dimer
FFUJ_06105	3.18865939373369	
FFUJ_00450	3.18837207934381	DUF3342 CHORD DUF3342 CHORD
FFUJ_03452	3.18499255466959	XFP_N XFP XFP_C
FFUJ_04150	3.18132993233328	Lactamase_B_2 Lactamase_B_2
FFUJ_13712	3.15775666020368	DUF3311 UPF0233 SPC25 PgaD
FFUJ_01923	3.15751590246838	
FFUJ_07032	3.15224572354922	
FFUJ_11560	3.15200538598582	
FFUJ_04079	3.15093501398108	Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr Mito_carr  Mito_carr Mito_carr
FFUJ_07670	3.13779260644839	Helo_like_N DUF3915 Helo_like_N DUF3915
FFUJ_06570	3.13600965247405	
FFUJ_09652	3.13123112110074	Sugar_tr
FFUJ_05465	3.12919160582262	
FFUJ_04978	3.12132806785996	
FFUJ_04155	3.1212631623423	Abhydrolase_2 Abhydrolase_2 Abhydrolase_2 Abhydrolase_2
FFUJ_08572	3.11747934187635	
FFUJ_11624	3.11117597671395	AA_permease
FFUJ_04875	3.09247085803874	Transglut_core Rad4 BHD_1 BHD_2 BHD_3 Transglut_core R ad4 BHD_1 BHD_2 BHD_3
FFUJ_10864	3.08241262470516	
FFUJ_14546	3.07970038033292	GFA
FFUJ_06002	3.07596694527089	
FFUJ_00971	3.05929663493733	
FFUJ_03123	3.05501613579196	Aminotran_3 DNA_ligase_IV
FFUJ_07604	3.04837417838655	SRAP SRAP
FFUJ_10330	3.0443410722556	
FFUJ_01273	3.04060835022442	
FFUJ_10879	3.02117551546606	
FFUJ_08864	3.01529676726524	CRAL_TRIO_N CRAL_TRIO
FFUJ_06378	3.01224684587689	
FFUJ_07236	3.00765689952714	Oxidored_q6 Oxidored_q6
FFUJ_09961	3.00428150177823	
FFUJ_01588	3.00219981406699	
FFUJ_04733	3.00151317370948	FNIP_N FNIP_N
FFUJ_02582	2.99063117820932	FAD_binding_2 Succ_DH_flav_C DUF600
FFUJ_13619	2.96528341325223	HAD_2
FFUJ_01434	2.9591647088046	
FFUJ_10865	2.95762675609354	
FFUJ_05863	2.95510624380812	
FFUJ_01841	2.9503784024308	
FFUJ_00998	2.9423727014819	
FFUJ_14684	2.94092501462648	CN_hydrolase
FFUJ_07082	2.9406192564396	DUF3305 DUF1471 DUF3305 DUF1471
FFUJ_13340	2.93363625367816	MFS_1 AzlC MFS_1



FFUJ_02494	2.93219286527231	Frag1
FFUJ_11973	2.93046579905967	Zn_clus Fungal_trans Fungal_trans_2
FFUJ_07312	2.9207725191971	Sdh5 Sdh5
FFUJ_14333	2.91589748634412	p450 p450
FFUJ_11610	2.91149471506474	PA_decarbox
FFUJ_00792	2.90663516770393	
FFUJ_02679	2.90210556732606	AF-4 SR-25
FFUJ_03514	2.89858742551332	
FFUJ_06991	2.89643843448949	Glycophorin_A DUF4448 TMEM154 Peptidase_M56 TMEM51 Herpes_gE IncA P12 DUF1049 DUF4733 Sarcoglycan_2 Glycophorin_A DUF4448 TMEM154 Peptidase_M56 TMEM51 Herpes_gE IncA P12 DUF1049 DUF4733 Sarcoglycan_2
FFUJ_13273	2.89635812927739	DnaJ
FFUJ_03398	2.88665761421586	ERG4_ERG24
FFUJ_05865	2.87852551453194	
FFUJ_10747	2.87214781633773	
FFUJ_11754	2.86683723950368	Lebercilin DUF3450 Baculo_PEP_C SWI-SNF_Ssr4 AATF-Che1 Spc7 SlyX Atg14 DUF1664 BLOC1_2 ERM DUF4407 Syntaxin-6_N Fmp27_WPPW FlxA COG2 Hemerythrin RRP7 MIase
FFUJ_05985	2.86449337279803	
FFUJ_05523	2.86358018125794	
FFUJ_03778	2.86153648188093	RTA1 RTA1
FFUJ_08939	2.85911767629164	DSPc DSPc
FFUJ_03368	2.85614653710255	ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_09990	2.85606734900355	
FFUJ_02489	2.84968015136107	Polyketide_cyc
FFUJ_04162	2.84663989275258	Complex1_51K SLBB NADH_4Fe-4S Complex1_51K SLBB NADH_4Fe-4S
FFUJ_08651	2.84350432766839	DUF1841 DNA_pol_A
FFUJ_13073	2.84068724122682	
FFUJ_06111	2.8300548214363	
FFUJ_12336	2.82940755277508	
FFUJ_07659	2.8250374643225	CAP CAP
FFUJ_02868	2.82448923083419	
FFUJ_13428	2.82274733797243	PAP2_3 PAP2_3
FFUJ_01361	2.81848521594421	
FFUJ_09890	2.81284489068325	SET
FFUJ_10297	2.8098634071938	
FFUJ_02409	2.80297718205489	F-box-like Elongin_A DUF3506
FFUJ_03606	2.78848208073093	Ceramidase
FFUJ_04695	2.78821149787098	MFS_1 MFS_1 MFS_1 MFS_1
FFUJ_14571	2.78303682796625	AA_permease
FFUJ_02620	2.78174466176846	ABC_membrane ABC_tran ABC_membrane ABC_tran
FFUJ_02020	2.77952816305298	
FFUJ_07130	2.77411962385887	
FFUJ_00447	2.77244722848822	DUF1275 DUF1275
FFUJ_04829	2.77146732756875	Transposase_21 DUF3127 Transposase_21 DUF3127
FFUJ_05859	2.77046856949667	
FFUJ_01906	2.75826295376028	
FFUJ_04151	2.75514834561119	DNA_pol_alpha_N DNA_pol_alpha_N
FFUJ_01839	2.75469005013833	
FFUJ_01223	2.75398366063672	
FFUJ_06989	2.74700588281114	Oxidored_FMN Oxidored_FMN
FFUJ_07018	2.73230777102863	Cyto_heme_lyase Cyto_heme_lyase Cyto_heme_lyase Cyto_heme_lyase
FFUJ_07878	2.73173966266971	FUN14 FUN14
FFUJ_09991	2.73151245240183	Fungal_trans_2
FFUJ_02061	2.72886306188497	
FFUJ_00243	2.72721794971583	MFS_1 TfoX_N MFS_1 TfoX_N
FFUJ_13701	2.72291132502804	adh_short adh_short
FFUJ_11953	2.72011943741713	
FFUJ_07198	2.71970467155611	ATP-synt ATP-synt

FFUJ_04060	2.71670892522755	Amidase YolD Amidase YolD
FFUJ_02367	2.71588049674495	AT_hook AT_hook CAF20 UvrD_C_2 Exonuc_VII_L AAA_13 Hemagglutinin DUF2408 Baculo_PEP_C SPX
FFUJ_00033	2.71384815224357	NAD_binding_2 NAD_binding_11 NAD_binding_2 NAD_binding_11
FFUJ_08021	2.71352838473066	Bac_luciferase Amidohydro_2 Bac_luciferase Amidohydro_2
FFUJ_03821	2.71183612553433	PRANC PRANC
FFUJ_11665	2.71125348064965	Abhydrolase_6
FFUJ_05614	2.70569646210055	
FFUJ_13345	2.70447769685766	WD40
FFUJ_11800	2.70279108201349	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_12327	2.70241642157994	Abhydrolase_3
FFUJ_04188	2.69867267250199	
FFUJ_05700	2.69502751068405	
FFUJ_05185	2.69030548399143	DUF2207 Asp4 UAA Cation_efflux ZT_dimer DUF2207 Asp4 UAA Cation_efflux ZT_dimer
FFUJ_14635	2.68497750272317	Acyl-CoA_ox_N Acyl-CoA_dh_M Acyl-CoA_dh_1 ACOX
FFUJ_13262	2.68449366433041	p450 AurF
FFUJ_07745	2.6761147887712	Glyco_hydro_43 Glyco_hydro_43 Glyco_hydro_43 Glyco_hydro_43
FFUJ_10526	2.66602442896273	
FFUJ_08319	2.66362317948665	Cytochrom_C
FFUJ_00164	2.65277074157936	DUF21 PTS_EIIC_2 HisKA_7TM Glucos_trans_II PLDc_N DUF3951 ATP-synt_J DUF21 PTS_EIIC_2 HisKA_7TM Glucos_trans_II PLDc_N DUF3951 ATP-synt_J
FFUJ_04785	2.65078562329578	Pyr_redox_2 Pyr_redox_2
FFUJ_00293	2.64803097870295	MFS_1 MFS_1
FFUJ_00721	2.64788414475754	
FFUJ_05079	2.64694826973657	SOR_SNZ DUF4398 SOR_SNZ DUF4398
FFUJ_07355	2.64661803988637	
FFUJ_08290	2.6459393634603	Band_7
FFUJ_03927	2.64383107462958	
FFUJ_09510	2.64025998867146	Inhibitor_I78
FFUJ_13511	2.63883290524764	Glyco_hydro_15 CBM_20
FFUJ_12212	2.63813793893378	HHH_8 DNA_pol_lambd_f DNA_pol_B_palm DNA_pol_B_thumb
FFUJ_07961	2.63704099632781	FTA4 Beta-Casp DUF3166 FTA4 Beta-Casp DUF3166
FFUJ_01931	2.63400849779316	
FFUJ_02678	2.63391721159685	ABC_tran
FFUJ_08903	2.63309577818265	Bac_small_Yrzi
FFUJ_08705	2.62946628735016	AA_permease
FFUJ_00882	2.62806325429874	
FFUJ_04163	2.62680662692907	Fucokinase Hexapep Fucokinase Hexapep
FFUJ_08574	2.6204416781562	His_Phos_2
FFUJ_07187	2.61897084616713	DAO Metal_hydrol DAO Metal_hydrol
FFUJ_10938	2.61780929118221	
FFUJ_04822	2.61463579383298	Exo5 Exo5
FFUJ_03136	2.61226272246591	Epimerase NAD_binding_4
FFUJ_00028	2.60156544460607	ADH_N ADH_N_2 ADH_zinc_N ADH_N ADH_N_2 ADH_zinc_N
FFUJ_05779	2.5996907219427	
FFUJ_04270	2.59758327370545	HIG_1_N AAA_23 DUF4407 HIG_1_N AAA_23 DUF4407
FFUJ_03384	2.59022962655559	Scs3p
FFUJ_00492	2.57812104310131	
FFUJ_07096	2.57488856987871	SmpA_OmlA FOXP-CC SmpA_OmlA FOXP-CC
FFUJ_04459	2.57199885427192	Aconitase Aconitase_C Aconitase Aconitase_C
FFUJ_02977	2.57182058307497	MFS_2 UPF0154
FFUJ_11420	2.56231882685802	LIP
FFUJ_02509	2.5593545158689	Asparaginase Ank_2
FFUJ_00475	2.54954534980332	
FFUJ_10491	2.54926261185459	
FFUJ_11384	2.53442768500437	GST_N GST_C_3
FFUJ_00544	2.53253112505781	

FFUJ_07535	2.52172333076411	Allexi_40kDa Syntaxin TMC05 Muted MCU FlgN SNARE PBP1_TM Allexi_40kDa Syntaxin TMC05 Muted MCU FlgN SNARE PBP1_TM
FFUJ_08716	2.51957429873276	INSIG UPF0139
FFUJ_05311	2.51713047452551	MTCP1 COX17 Pet191_N MTCP1 COX17 Pet191_N
FFUJ_06208	2.51085723387349	
FFUJ_12295	2.50836970403172	
FFUJ_10431	2.50628416823613	
FFUJ_12986	2.50239580632626	EcKinase
FFUJ_07243	2.49674762698269	zf-AN1 zf-AN1
FFUJ_03270	2.49572677372823	zf-C2H2_aberr zf-TRAF zf-C2HE zf-C2H2
FFUJ_03317	2.49437781176068	MFS_1 MFS_1
FFUJ_05873	2.49427407566098	
FFUJ_08468	2.49347890887644	Baculo_PEP_C
FFUJ_05693	2.49078414339117	
FFUJ_09835	2.48921354197681	MFS_1 OAD_gamma
FFUJ_07958	2.48917903438903	Mnd1 DUF3425 Mnd1 DUF3425
FFUJ_01262	2.48914452727962	
FFUJ_00539	2.48507604516784	
FFUJ_02191	2.48256243302057	Cytochrom_B561
FFUJ_10748	2.48182260738484	
FFUJ_06922	2.47883114479647	Chorein_N VPS13 VPS13_mid_rpt AP4E_app_platf SHR-BD VPS13_C ATG_C VPS13_C Chorein_N VPS13 VPS13_mid_rpt AP4E_app_platf SHR-BD VPS13_C ATG_C VPS13_C
FFUJ_01888	2.47725090947086	
FFUJ_08985	2.47495106439624	Cation_ATPase_N E1-E2_ATPase E1-E2_ATPase Hydrolase Cation_ATPase_C
FFUJ_06242	2.46986125435885	
FFUJ_01822	2.46353505380441	
FFUJ_08278	2.46198163471343	MFS_1 PepSY_TM
FFUJ_04158	2.45147491643481	NPC1_N Folate_rec Sterol-sensing Patched NPC1_N Folate_rec Sterol-sensing Patched
FFUJ_10497	2.45091423369638	
FFUJ_13275	2.44760372513609	Grp1_Fun34_YaaH DUF2254
FFUJ_04187	2.44738318362189	DUF3460 DUF3460
FFUJ_02976	2.44295959069407	
FFUJ_02424	2.44163914984662	HisKA HATPase_c Response_reg
FFUJ_07927	2.43884826087782	Myb_DNA-bind_6 DUF1446 Myb_DNA-binding Myb_DNA-bind_6 DUF1446 Myb_DNA-binding
FFUJ_13561	2.43562157894909	Zn_clus Fungal_trans_2
FFUJ_04877	2.43310739358121	MTP18 MTP18
FFUJ_13739	2.43115183809483	DUF2427 Ytp1
FFUJ_00265	2.42547952350905	AA_permease_2 YlaH AA_permease_2 YlaH
FFUJ_07791	2.42139761142107	Pro-kuma_activ Peptidase_S8 Pro-kuma_activ Peptidase_S8
FFUJ_10807	2.41460968461344	
FFUJ_06058	2.4124348807455	
FFUJ_13412	2.41218406791911	Aminotran_1_2
FFUJ_07302	2.40951035307841	SUR7 GP38 Rhabdo_glycop TMEM52 DUF1049 Herpes_gE LYRIC SUR7 GP38 Rhabdo_glycop TMEM52 DUF1049 Herpes_gE LYRIC
FFUJ_02065	2.40902605961536	
FFUJ_11091	2.40877560119275	
FFUJ_02988	2.40842500314658	Cupin_2
FFUJ_13776	2.40767389344409	
FFUJ_09006	2.40453845675036	DJ-1_PfpI
FFUJ_09062	2.40427179968894	Dynamin_N Dynamin_M Dynamin_M GED
FFUJ_01724	2.40353864523862	
FFUJ_00718	2.39467521600842	
FFUJ_12688	2.38510040450991	Peptidase_S8 PA fn3_5 FlgD_ig
FFUJ_05991	2.3824897378553	
FFUJ_08715	2.3817467165215	
FFUJ_01220	2.38141655920252	
FFUJ_02854	2.3801623787255	Pet127

FFUJ_05118	2.3796509947884	Chitin_bind_1 Chitin_bind_1 Glyco_hydro_18 Chitin_bind_1 Chitin_bind_1 Glyco_hydro_18
FFUJ_06307	2.37653557847273	
FFUJ_00842	2.37607438232693	
FFUJ_12690	2.37531689723544	
FFUJ_06721	2.37367102350745	F-box-like Baculo_p47 F-box-like Baculo_p47
FFUJ_04740	2.3729800966657	F-box-like F-box-like
FFUJ_07081	2.37062916299861	
FFUJ_07045	2.37053057335351	F-box-like F-box-like
FFUJ_01347	2.36860889457995	
FFUJ_09696	2.36636070363238	Sulfate_transp DMT_6 STAS
FFUJ_02516	2.36522921122183	
FFUJ_04951	2.36162516555763	COX5A PPR_2 PPR PPR_2 ECSIT PPR_3 Taq-exonuc COX5A PPR_2 PPR PPR_2 ECSIT PPR_3 Taq-exonuc
FFUJ_00240	2.36016872593905	Methyltransf_23 Methyltransf_23
FFUJ_13670	2.35850065249695	DUF2427 Ytp1
FFUJ_02566	2.35538027327681	DUF4243
FFUJ_11677	2.35223141335054	TraG-D_C
FFUJ_07705	2.35201946536552	Aldo_ket_red Dev_Cell_Death Aldo_ket_red Dev_Cell_Death
FFUJ_08733	2.3519705570042	ATP11
FFUJ_13800	2.3373276704251	DHDPS Peripla_BP_4 PEP_mutase CbiD
FFUJ_07706	2.33488258097944	eRF1_1 eRF1_2 RGS12_us2 eRF1_3 eRF1_1 eRF1_2 RGS12_us2 eRF1_3
FFUJ_06271	2.33337793792973	
FFUJ_12711	2.33222988467062	p450
FFUJ_05104	2.32774012340897	Peptidase_C48 Peptidase_C48
FFUJ_02358	2.32719160943443	
FFUJ_11751	2.32696578830914	DUF3237
FFUJ_11202	2.32678837279756	DUF3129 Peptidase_S3
FFUJ_09543	2.32607884600833	DUF2700 FAM176
FFUJ_07955	2.32570804311794	GFO_IDH_MocA GFO_IDH_MocA_C Myosin_N GFO_IDH_MocA GFO_IDH_MocA_C Myosin_N
FFUJ_13323	2.32562744161602	AA_permease_2
FFUJ_07275	2.31992794956555	GFA DNA_ligase_ZBD GFA DNA_ligase_ZBD
FFUJ_07630	2.31893117182338	Oxysterol_BP DUF1579 Oxysterol_BP DUF1579
FFUJ_11755	2.31857757945133	
FFUJ_09818	2.3135687970502	
FFUJ_00994	2.31331222828746	
FFUJ_00434	2.31278314507054	AT_hook Slx4 AT_hook Slx4
FFUJ_04197	2.31066802200509	DAO DAO
FFUJ_13753	2.30905093875896	Bromodomain Peptidase_S41
FFUJ_05557	2.30893890562656	
FFUJ_01363	2.30513301167065	
FFUJ_05660	2.2916869787361	
FFUJ_05474	2.28681554124103	
FFUJ_04604	2.28678383946587	
FFUJ_05114	2.2818595571129	RSN1_TM PHM7_cyt PHM7_cyt RSN1_7TM PHM7_ext RSN1_TM PHM7_cyt PHM7_cyt RSN1_7TM PHM7_ext
FFUJ_07065	2.28097399686429	
FFUJ_04884	2.27551011606229	
FFUJ_04964	2.27476892299348	LON_substr_bdg AAA ClpB_D2-small Lon_C LON_substr_bdg AAA ClpB_D2-small Lon_C
FFUJ_09936	2.26693024650093	GAF HisKA HATPase_c Response_reg
FFUJ_12309	2.26212711419118	tRNA_anti-codon tRNA-synt_2 DUF2156
FFUJ_02917	2.25921253753118	DUF1581
FFUJ_07333	2.25666145306321	IlvN IlvC IlvN IlvC
FFUJ_05522	2.25644247589491	
FFUJ_04490	2.25405075283578	
FFUJ_00876	2.25056931688753	
FFUJ_12271	2.24768521127238	RNA_pol_I_TF
FFUJ_00965	2.24617448183388	
FFUJ_12125	2.2446647677971	
FFUJ_08280	2.24432249962228	PQ-loop PQ-loop

FFUJ_03859	2.23762767142829	Pal1 Pal1
FFUJ_08044	2.23491505767611	DUF2207 DUF2207
FFUJ_02532	2.23359868918959	
FFUJ_02989	2.232252150246	zf-C2H2 zf-C2H2 Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_02820	2.2298242430835	NDUFA12
FFUJ_03122	2.22919063860113	Aldedh DUF126
FFUJ_01720	2.22460624214545	
FFUJ_02240	2.22308020605114	FAD_binding_3 OAD_beta
FFUJ_00535	2.22178620850595	
FFUJ_00973	2.21281064211472	
FFUJ_11726	2.21012811335651	MFS_1
FFUJ_00826	2.20902538881482	
FFUJ_05507	2.20355056102841	
FFUJ_09843	2.20049790773812	DUF3669
FFUJ_07396	2.19802835887255	CsbD CsbD CsbD CsbD
FFUJ_04290	2.19475515056113	
FFUJ_00528	2.19420755508147	
FFUJ_02536	2.19227685085158	
FFUJ_03518	2.19112228139336	Flavokinase
FFUJ_13454	2.19080336285632	Hus1
FFUJ_13832	2.18887565400775	Exo_endo_phos RhoGAP
FFUJ_03141	2.18866325449526	Nucleoside_tran Herpes_UL45
FFUJ_13057	2.18843570646018	COG2 Spc7 Sas10 TPR_MLP1_2 DUF4611
FFUJ_01599	2.18754091369499	
FFUJ_09057	2.18614637359681	Acetyltransf_1
FFUJ_00149	2.18510105196588	
FFUJ_13559	2.18349616918925	TPR_16 TPR_11 TPR_12 TPR_11 TPR_14 Coatomer_WDAD DUF4192 TPR_16 DUF4192 TPR_2 TPR_19
FFUJ_04147	2.18204370764736	Abhydrolase_3 Abhydrolase_3
FFUJ_03501	2.18178660163026	Peptidase_C2 Adeno_E3
FFUJ_01587	2.18149928369628	
FFUJ_13229	2.18030505163713	Glyco_hydro_72
FFUJ_01493	2.17793364469248	
FFUJ_03814	2.17772230694768	Sulfotransfer_3 Sulfotransfer_3
FFUJ_13194	2.17615301128694	Glyoxalase_4 Glyoxalase
FFUJ_13779	2.1759720114957	Complex1_LYR_2 DUF3135
FFUJ_04339	2.17583627153187	Pox_Ag35 Voldacs DUF2461 Pox_Ag35 Voldacs DUF2461
FFUJ_06194	2.17357518501941	
FFUJ_14400	2.17218954796322	
FFUJ_11426	2.17083488819279	HisKA HATPase_c Glyco_trans_4_4 Response_reg
FFUJ_00720	2.16778247879503	
FFUJ_02190	2.16676095678307	AATase
FFUJ_11698	2.16519956001706	Trypsin_2
FFUJ_09741	2.16518455204937	Syja_N
FFUJ_07870	2.1613309511193	Abi Abi
FFUJ_11829	2.16100138974763	MFS_1 MFS_1
FFUJ_01190	2.15984832062917	
FFUJ_07908	2.15935433651256	Lipase_3 Lipase_3
FFUJ_11847	2.15334577519496	tRNA-synt_2c KASH_CCD tRNA_SAD
FFUJ_03344	2.15276374550218	DUF3336 Patatin
FFUJ_03264	2.15255485014113	DUF4149 DUF1772
FFUJ_01057	2.15249516947546	
FFUJ_07033	2.15143611296586	MFS_1 CLN3 MFS_1 CLN3
FFUJ_07410	2.14296754391949	Aldo_ket_red Aldo_ket_red
FFUJ_10755	2.14290812906671	
FFUJ_09171	2.14218043079554	Nup54 Mod_r IncA DUF2207 Apo-CIII FTR1 DUF1049 FTCD_C DUF2353 TMF_TATA_bd
FFUJ_07017	2.14071093718541	DUF647 DUF647
FFUJ_05115	2.1321515703204	Abhydrolase_1 Abhydrolase_1
FFUJ_01916	2.13206289847332	
FFUJ_04227	2.13120592738255	MFS_1 GTP_EFTU_D4 MFS_1 GTP_EFTU_D4
FFUJ_03271	2.13062988188839	
FFUJ_13193	2.12955206132893	NPR2 GIT1_C

FFUJ_07199	2.12443617348011	
FFUJ_03620	2.12437727241889	
FFUJ_08409	2.12256686175671	COX6B
FFUJ_13069	2.12140489144897	
FFUJ_04526	2.11968516726746	MscL DUF3329 ATP-synt_E C1_1 Zn_ribbon_17 MscL DUF3329 ATP-synt_E C1_1 Zn_ribbon_17
FFUJ_13887	2.1189066057729	CoA_trans CoA_trans CoA_trans CoA_trans
FFUJ_14045	2.11783471566065	Glyco_hydro_36N Glyco_transf_36 Melibiase Glyco_hydro_36C Glyco_hydro_36N Glyco_transf_36 Melibiase Glyco_hydro_36C
FFUJ_11039	2.11739437009726	
FFUJ_01869	2.11683673048414	
FFUJ_00412	2.11550192723685	Bax1-I Bax1-I
FFUJ_01221	2.11532597205117	
FFUJ_00737	2.1152819855415	
FFUJ_14280	2.11170747688322	Aa_trans Glucokinase Aa_trans Glucokinase
FFUJ_04696	2.11015649920378	HIT HIT
FFUJ_11513	2.10666366198083	MFS_1 YibE_F
FFUJ_08941	2.10441611067917	Longin Synaptobrevin
FFUJ_05994	2.10402230660514	
FFUJ_05464	2.10378897600323	
FFUJ_06498	2.10294336946188	
FFUJ_13380	2.10220009971805	
FFUJ_05425	2.10177757330514	
FFUJ_03112	2.10152992489241	DUF155
FFUJ_07954	2.10021933114231	FAD_binding_4 BBE FAD_binding_4 BBE
FFUJ_00834	2.09899684773776	
FFUJ_10041	2.09838587290238	Aminotran_4
FFUJ_13757	2.09822588507402	Promethin VIT1
FFUJ_11379	2.09822588507402	PAP2_3 RtcB PAP2_3
FFUJ_04572	2.0973098261076	PMI_type1 Hanta_G1 PMI_type1 Hanta_G1
FFUJ_07343	2.0938963076725	
FFUJ_10496	2.09108252600561	
FFUJ_02108	2.0909665749839	FSH1 PAS_3
FFUJ_04374	2.09089410886035	
FFUJ_06977	2.08639164877448	DUF1264 DUF1264
FFUJ_05052	2.08636272544519	DUF676 DUF676 DUF676 DUF676 DUF676 DUF676
FFUJ_01397	2.08474365877368	
FFUJ_02429	2.08358795188187	MARVEL
FFUJ_01895	2.08344353357566	
FFUJ_04257	2.08244732004725	AAA_23 IQ DUF1246 AAA_23 IQ DUF1246
FFUJ_03862	2.07951919234641	zf-MYND zf-C3HC4_2 zf-B_box zf-MYND zf-C3HC4_2 zf-B_box
FFUJ_08279	2.07947595041005	Fringe
FFUJ_11584	2.07763179852113	
FFUJ_08842	2.0765232138262	DHH DHHA2
FFUJ_08100	2.07589000245816	FMO-like
FFUJ_04164	2.07478234715238	
FFUJ_04712	2.07297109499694	ResIII Helicase_C ResIII Helicase_C
FFUJ_01376	2.07292798922302	
FFUJ_10292	2.07170703137478	
FFUJ_11397	2.07167831161609	ArAE_2_N FUSC_2 ArAE_2
FFUJ_11851	2.06733186421473	adh_short DUF1771 Glyco_transf_4 Toprim_4
FFUJ_02488	2.06701663589465	Adaptin_N
FFUJ_07408	2.06677308329638	VIR_N VIR_N
FFUJ_12565	2.06677308329638	Homeobox_KN Elf1 zf-met HTH_Tnp_Tc5
FFUJ_07809	2.06393852454767	Kei1 Kei1
FFUJ_06226	2.06085071221222	
FFUJ_03857	2.05967969728908	CKS CKS
FFUJ_13618	2.05943700918818	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_06722	2.05605662821691	PLDc_2 PLDc_2 PLDc_2 PLDc_2
FFUJ_13579	2.05578586757418	CoA_trans CoA_trans
FFUJ_09340	2.05527294518831	DUF1049

FFUJ_04068	2.05399119904478	FAD_binding_3 Phage_tail_2 FAD_binding_3 Phage_tail_2
FFUJ_05987	2.0516860700021	
FFUJ_01038	2.05115995291667	
FFUJ_03816	2.05063397074427	OPT OPT
FFUJ_05632	2.04973868980759	
FFUJ_14569	2.04807706207926	DLH
FFUJ_09595	2.04731061135504	DUF498
FFUJ_01853	2.04674305500749	
FFUJ_02416	2.04638841219136	Cyt-b5 Oxidored_molyb Mo-co_dimer BNR
FFUJ_08058	2.04505550501517	Mac Hexapep Hexapep_2 Mac Hexapep Hexapep_2
FFUJ_13655	2.04297280530181	R3H G-patch
FFUJ_01536	2.03997291858572	
FFUJ_05748	2.03971841419701	
FFUJ_01199	2.03707627404141	
FFUJ_03547	2.0331124333378	
FFUJ_05874	2.03277424239229	
FFUJ_03616	2.03212620031312	FAA_hydrolase
FFUJ_09514	2.03183042370568	
FFUJ_06005	2.03107005295178	
FFUJ_11409	2.03076035386	
FFUJ_05971	2.02890315074348	
FFUJ_04062	2.02703359573086	MA3 DUF3526 ABM FemAB_like MA3 DUF3526 ABM FemA B_like
FFUJ_07628	2.02640142964761	Cid2 Cid2
FFUJ_07047	2.02516576344016	DUF1674 DUF1674
FFUJ_01637	2.02433772738314	
FFUJ_09896	2.01827113578151	
FFUJ_07665	2.01797737578307	Arrestin_N Arrestin_N Arrestin_C Arrestin_N Arrestin_N Arrestin_C
FFUJ_02780	2.01719422480386	WBP-1 Hum_adeno_E3A She9_MDM33 DUF4381 RCR
FFUJ_01808	2.01585238730701	
FFUJ_02538	2.01543324616789	Es2
FFUJ_08649	2.01410654074826	Glyco_transf_28 UDPGT ATG_C Pox_A_type_inc
FFUJ_05514	2.01360401743171	
FFUJ_07429	2.01112116079694	Arrestin_N Arrestin_N Arrestin_N Arrestin_N
FFUJ_07513	2.00928191842625	F-box F-box
FFUJ_02734	2.00763917117644	MutS_I MutS_II MutS_III DUF4911 MutS_IV MutS_V
FFUJ_10071	2.0020527683987	GST_C_3 tRNA-synt_1c tRNA-synt_1c_C
FFUJ_08723	2.00048526188665	
FFUJ_07127	2.00030500801455	AhpC-TSA_2 AhpC-TSA_2
tRNA-Ile(AAT)	1	
tRNA	1	
tRNA	1	
tRNA	1	
tRNA	1	
tRNA	1	
tRNA	1	
tRNA	1	

#### Anexo 1.D Genes reprimidos por la mutación carS en oscuridad

FFUJ_05918	0	
FFUJ_00006	0.0062555393774996	p450 p450
FFUJ_00004	0.0093188652163454	MFS_1 MFS_1
FFUJ_00007	0.0094268402807143	p450 p450
FFUJ_00005	0.0102066978496716	FAD_binding_4 BBE FAD_binding_4 BBE
FFUJ_14801	0.0175376590741798	
FFUJ_00008	0.0227424264871939	DUF982 Dimerisation Methyltransf_2 DUF982 Dimerisation Methyltransf_2
FFUJ_14071	0.0232699190142537	Glyco_trans_2_3 Transgly_assoc Glyco_trans_2_3 Transgly_assoc
FFUJ_10626	0.0235743205349136	
FFUJ_06747	0.0236863547501344	MFS_1 MFS_1

FFUJ_08866	0.0253533465403719	adh_short
FFUJ_03450	0.0293802401793979	Fic
FFUJ_12834	0.0303216064441241	Sulfatase
FFUJ_00003	0.0334314560345033	AMP-binding AMP-binding_C PP-binding Condensation Condensation AMP-binding AMP-binding_C PP-binding Condensation AMP-binding AMP-binding_C PP-binding Condensation AMP-binding AMP-binding_C PP-binding Condensation Condensation AMP-binding AMP-binding_C PP-binding Condensation AMP-binding AMP-binding_C PP-binding Condensation AMP-binding AMP-binding_C PP-binding Condensation
FFUJ_00009	0.0343949364437084	DUF3425 Cyt-b5 DUF3425 Cyt-b5
FFUJ_04797	0.0358667292593036	ABC_tran FERM_M ABC_tran_Xtn ABC_tran DUF3710 ABC_tran FERM_M ABC_tran_Xtn ABC_tran DUF3710
FFUJ_11371	0.0390054627747912	Abhydrolase_3
FFUJ_02348	0.0426810654227802	ABC2_membrane_3 ABC_tran ABC2_membrane_3 ABC_tran
FFUJ_06745	0.0426881662358315	NmrA NmrA
FFUJ_03458	0.0428717167604607	AA_permease_2
FFUJ_08055	0.0474802058496754	Peptidase_S58 Peptidase_S58
FFUJ_03645	0.0486404369776872	Pro-kuma_activ Peptidase_S8
FFUJ_10795	0.0487072384713056	
FFUJ_11323	0.0491692445641536	
FFUJ_11613	0.050377732566179	
FFUJ_02349	0.0507464249763608	GFO_IDH_MocA
FFUJ_14072	0.0541182875701836	Fringe PAN_4 Fringe PAN_4
FFUJ_11980	0.0546168530286052	ABC_membrane ABC_tran
FFUJ_10318	0.0550856365987645	
FFUJ_09374	0.0572428772664607	CBM_20
FFUJ_10200	0.0577061943311357	Aminotran_1_2
FFUJ_06746	0.0610493607920363	Zn_clus Fungal_trans Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_09918	0.06113659441308	Nucleotid_trans
FFUJ_11480	0.062797894535101	B_lectin B_lectin BofC_C
FFUJ_03721	0.0638269712437105	PBP_like_2 PBP_like_2
FFUJ_06401	0.0646619130023732	
FFUJ_01948	0.0663375710940086	
FFUJ_10761	0.0688728887602944	
FFUJ_11062	0.069698914607595	
FFUJ_07484	0.070699312688385	Acyl_transf_3 Acyl_transf_3
FFUJ_14721	0.0718768004574015	MFS_1
FFUJ_03455	0.0724520338779581	Chitin_bind_1 Polysacc_deac_1 Chitin_bind_1 Chitin_bind_1
FFUJ_14707	0.0732645951583299	NmrA
FFUJ_12654	0.0753708252845564	GrpB
FFUJ_05494	0.0773347157906157	
FFUJ_08678	0.0773363239375422	Aminotran_3
FFUJ_02291	0.0779601134349971	
FFUJ_11945	0.0792069041508107	Hexokinase_1 Hexokinase_2
FFUJ_12470	0.080834221309395	DUF2156
FFUJ_06878	0.0869120485002596	PhzC-PhzF PhzC-PhzF
FFUJ_10924	0.0871859817927621	
FFUJ_11575	0.0888496559510469	Epimerase
FFUJ_03678	0.0938109408903659	PyocinActivator ATP_transf
FFUJ_03393	0.0957416181637367	Acetyltransf_1
FFUJ_01929	0.09762469864019	
FFUJ_14038	0.0998904107860128	Aldo_ket_red TRI9 Aldo_ket_red TRI9
FFUJ_02295	0.100001947408158	FMN_bind_2
FFUJ_10052	0.100234426043854	Aldedh
FFUJ_12144	0.100829521003362	Ribonuc_L-PSP
FFUJ_04634	0.10522431332112	Acetyltransf_1 Acetyltransf_1
FFUJ_14542	0.105899670089141	DAO
FFUJ_00010	0.10701240868747	adh_short_C2 ketoacyl-synt Ketoacyl-synt_C adh_short_C2 ketoacyl-synt Ketoacyl-synt_C
FFUJ_14263	0.108602558785399	MFS_1 MFS_1



FFUJ_12143	0.109828166495175	Aldedh
FFUJ_12471	0.112819628767963	Methyltransf_7
FFUJ_02077	0.1148545567041	
FFUJ_12021	0.116582245499803	ABC_membrane RebB ABC_tran ABC_membrane ABC_tran
FFUJ_02308	0.117329687134201	Zn_clus Fungal_trans_2
FFUJ_10053	0.119180490892056	MFS_1
FFUJ_03904	0.120213431239687	
FFUJ_11968	0.125136104177831	RTA1
FFUJ_14173	0.125373122385097	Glyoxalase_3 Glyoxalase_3
FFUJ_10050	0.125453967324166	Methyltransf_7
FFUJ_05097	0.126970918134289	DUF2828 DUF2828
FFUJ_08826	0.131211856950654	EutQ
FFUJ_09490	0.131846392251454	AAA
FFUJ_11314	0.133364814767402	
FFUJ_00260	0.133761978778996	
FFUJ_14752	0.134566387663331	Fungal_trans_2
FFUJ_10627	0.135232142233586	
FFUJ_08095	0.13606613975654	Methyltransf_23
FFUJ_13120	0.136241676669762	Glyco_transf_54 Glyco_transf_54 Glucos_trans_II
FFUJ_12833	0.136547045156684	Sulfotransfer_3 SIS
FFUJ_00021	0.137118962150544	DJ-1_PfpI DJ-1_PfpI
FFUJ_14211	0.137769649113176	
FFUJ_10054	0.138023899183305	FSH1
FFUJ_06788	0.139269379559886	DUF4238 PI3_PI4_kinase TPD52 DUF4238 PI3_PI4_kinase T PD52
FFUJ_10058	0.14007098064957	ketoacyl-synt Ketoacyl- synt_C KAsynt_C_assoc Acyl_transf_1 PS- DH Methyltransf_12 KR PP- binding Condensation HxxPF_rpt AMP-binding AMP- binding_C PP-binding NAD_binding_4
FFUJ_10055	0.14033239586308	Asp
FFUJ_14739	0.141086318694172	Zip
FFUJ_03644	0.1413858846432	Asp
FFUJ_00012	0.14167332001973	bZIP_1 Ank_3 Ank_2 V-ATPase_H_N bZIP_1 Ank_3 Ank_2 V- ATPase_H_N
FFUJ_10517	0.142085378034568	
FFUJ_10319	0.142111971764374	
FFUJ_10051	0.142501597730137	p450
FFUJ_06457	0.143394341507274	
FFUJ_14718	0.144088789560853	Peptidase_M13_N Peptidase_M13
FFUJ_09690	0.14505983317774	Amidase
FFUJ_11443	0.145833088575253	Abhydrolase_5
FFUJ_08849	0.145956462961929	DUF4821 Acetyltransf_7
FFUJ_01333	0.148700355337342	
FFUJ_00022	0.148759117547141	
FFUJ_03473	0.149962116753166	DAO
FFUJ_08932	0.150170152556115	ComA DUF2542
FFUJ_09278	0.151981749993383	
FFUJ_14727	0.153150289587197	
FFUJ_10056	0.153813069558527	GST_N GST_C
FFUJ_01408	0.156226381182753	
FFUJ_01433	0.157451564736132	
FFUJ_13051	0.157689663477485	ETRAMP
FFUJ_06458	0.157776035818539	
FFUJ_10181	0.159048646528264	Fructosamin_kin
FFUJ_01604	0.159327808860869	
FFUJ_06504	0.15998737853996	
FFUJ_13132	0.159994032366343	Methyltransf_31 DUF2194
FFUJ_06557	0.160017322938013	
FFUJ_12853	0.160493858837032	
FFUJ_13996	0.1607209609288	Hydrophobin Hydrophobin
FFUJ_02118	0.161295713063874	MFS_1
FFUJ_10126	0.162481796355506	A AP1_PANP_C Podoplanin

FFUJ_14123	0.163794634067787	
FFUJ_06667	0.164815062270488	
FFUJ_14652	0.165294428232724	adh_short Thioredoxin GCN5L1
FFUJ_06471	0.165512261039019	
FFUJ_04859	0.167813420292055	RTA1 DUF4131 RTA1 DUF4131
FFUJ_06421	0.168177895241823	
FFUJ_10742	0.169402843940768	
FFUJ_10791	0.169766063989064	
FFUJ_11063	0.169976829148528	
FFUJ_04206	0.172544453056306	RTA1 RTA1
FFUJ_03399	0.17264733860163	Glyco_hydro_3 Glyco_hydro_3_C Fn3-like
FFUJ_14119	0.173353635792211	ECH_1 ECH_1
FFUJ_04116	0.174731303677577	PARG_cat PARG_cat
FFUJ_14665	0.174860944272976	Methyltransf_11
FFUJ_00815	0.177392878695476	
FFUJ_12832	0.17858960321752	Peptidase_M13_N DUF1542 Peptidase_M13
FFUJ_10202	0.178613124653539	HpcH_Hpal DUF2156
FFUJ_07053	0.178658938446085	Glyoxalase_2 Glyoxalase_2
FFUJ_12031	0.179066826885618	DUF3632
FFUJ_10192	0.17922452826351	Polysacc_deac_1
FFUJ_09995	0.179485599076488	Tyrosinase
FFUJ_00577	0.179676047248763	
FFUJ_01729	0.179968959317705	
FFUJ_10163	0.181219486300782	NAD_binding_8
FFUJ_03382	0.182023925750073	
FFUJ_09200	0.182416735729371	adh_short
FFUJ_12459	0.185633629659996	MFS_1
FFUJ_13964	0.185846058968357	ADH_N_assoc ADH_N Lyase_1 ADH_zinc_N ADH_N_assoc ADH_N Lyase_1 ADH_zinc_N
FFUJ_14634	0.186118065227444	
FFUJ_02036	0.186575311511067	
FFUJ_12835	0.186583071121491	Glyco_hydro_65N Glyco_hydro_65m Glyco_hydro_65m Glyco_hydro_65C F5_F8_type_C
FFUJ_06756	0.187400927703714	Hydant_A_N Hydantoinase_A DUF917 Hydant_A_N Hydantoinase_A DUF917
FFUJ_12976	0.187619280807193	VIT VWA_3
FFUJ_14101	0.18847564313948	GST_N GST_C GST_N GST_C
FFUJ_10798	0.190557725037778	
FFUJ_07565	0.191326683602354	ICL ICL
FFUJ_09911	0.191528368507647	peroxidase
FFUJ_12863	0.191549610861332	HET
FFUJ_10678	0.191941689196992	
FFUJ_08066	0.191993583308749	Acyl-CoA_dh_N Acyl-CoA_dh_M Acyl-CoA_dh_1 Prot_ATP_ID_OB
FFUJ_10588	0.194109145809961	
FFUJ_02256	0.195304893159088	Methyltransf_23
FFUJ_11771	0.195761640282039	
FFUJ_05611	0.196059030610612	
FFUJ_05496	0.196419490638338	
FFUJ_12445	0.198271607019263	Antibiotic_NAT
FFUJ_00121	0.198528770377011	Zn_clus TLE_N Zn_clus TLE_N
FFUJ_00153	0.198800046573845	NACHT NACHT
FFUJ_10104	0.19894892379868	DUF4064 RGS
FFUJ_03864	0.19895168183551	FAD_binding_6 NAD_binding_1 FAD_binding_6 NAD_binding_1
FFUJ_07696	0.199082732636049	NMO NMO NMO NMO
FFUJ_06710	0.199544165304325	DAO DAO
FFUJ_12536	0.199663150353684	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_12909	0.199995577061133	DUF4512 PAN_4 MANEC
FFUJ_12347	0.200203624753691	
FFUJ_10156	0.200259140680691	
FFUJ_07137	0.201064460052944	Glyoxalase_2 Glyoxalase_2
FFUJ_11638	0.20117180148868	Zn_clus Fungal_trans_2

FFUJ_00162	0.201519311042978	Abhydrolase_1 Abhydrolase_1
FFUJ_14030	0.201577986251137	CBM_4_9 CBM_4_9
FFUJ_10057	0.20412290726604	DUF1100
FFUJ_00026	0.205169758193897	MARVEL Flp_Fap MARVEL Flp_Fap
FFUJ_07642	0.205236609117156	DUF1768 DUF1768
FFUJ_12607	0.20714027584272	Acetyltransf_3
FFUJ_08189	0.208066989483798	AAA_16
FFUJ_12703	0.210329045693999	Ank_2 Ank_5 Ank_2 Ank
FFUJ_05362	0.210642725687105	
FFUJ_14689	0.211549913366879	Asp_Glu_race
FFUJ_07256	0.212234338293756	Methyltransf_23 Methyltransf_23
FFUJ_02294	0.212794091760242	Acetyltransf_1
FFUJ_11483	0.215662912049029	Sugar_tr
FFUJ_13128	0.215798987347101	AAA
FFUJ_03693	0.216540682301557	Aldedh Herpes_UL42
FFUJ_07518	0.216857613536258	Acetyltransf_1 Acetyltransf_1
FFUJ_12608	0.219741611874335	
FFUJ_08092	0.221782893910781	Glyco_hyd_65N_2
FFUJ_12836	0.221849006883559	
FFUJ_00088	0.222375537851114	Helo_like_N Baculo_PEP_C DUF1664 Reo_sigmaC Ank_2 Helo_like_N Baculo_PEP_C DUF1664 Reo_sigmaC Ank_2
FFUJ_14791	0.222878599075978	Sulfate_transp STAS
FFUJ_09074	0.223678733155432	zf-C2H2 zf-C2H2 AT_hook
FFUJ_12991	0.224355739993609	Sugar_tr
FFUJ_12802	0.225387592030792	MFS_1
FFUJ_05481	0.227369398339611	
FFUJ_11643	0.227845850226428	adh_short
FFUJ_14773	0.227995933808512	GPD Pase_memb DUF3712
FFUJ_10246	0.228936595317644	
FFUJ_00196	0.229289151099527	Aldedh Aldedh
FFUJ_11769	0.229352732364802	But2
FFUJ_13783	0.230134630378409	DUF2205 SKA2 DUF972 FlaC_arch bZIP_1 JIP_LZII
FFUJ_11642	0.230700014530371	Amidase
FFUJ_09201	0.231781929744824	Aldedh
FFUJ_14262	0.232011786000102	PI-PLC-X PI-PLC-X
FFUJ_06730	0.232188753603911	Acyl-CoA_dh_N Acyl-CoA_dh_M Acyl-CoA_dh_1 Acyl-CoA_dh_N Acyl-CoA_dh_M Acyl-CoA_dh_1
FFUJ_08032	0.232688207051348	Methyltransf_23 Methyltransf_23
FFUJ_12060	0.232714014430333	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_02314	0.234105380865255	DUF4345 DUF4440 DUF2065
FFUJ_08026	0.234287193251725	PAN_1 PAN_1 PAN_1 PAN_1
FFUJ_10362	0.234773259333423	
FFUJ_12838	0.234908366104886	
FFUJ_03184	0.23727631458276	AMP-binding AMP-binding_C
FFUJ_14857	0.23820407517013	UNC-93
FFUJ_06528	0.238354373106029	
FFUJ_09197	0.238749563397513	
FFUJ_11996	0.239674777812298	NRDD Fer4_14 Radical_SAM
FFUJ_09199	0.241243169507077	Sugar_tr DUF2070 AmiS_Urel
FFUJ_00197	0.241584533524472	Epimerase Epimerase Epimerase Epimerase
FFUJ_14866	0.241897874858388	DUF4267
FFUJ_06853	0.242218338229278	
FFUJ_14774	0.243318850703435	Adaptin_N Adaptin_N Adaptin_N Adaptin_N
FFUJ_09300	0.243428501656933	FTP
FFUJ_11438	0.243658085072042	peroxidase peroxidase peroxidase
FFUJ_05777	0.243707068360268	
FFUJ_09329	0.243920006666031	IncA Baculo_p24 TMF_DNA_bd Fib_alpha Reo_sigmaC Exonu c_VII_L Tropomyosin_1 Pox_A_type_inc Gp-FAR-1 BLOC1_2 F_actin_bind T_Ag_DNA_bind TMF_TATA_bd
FFUJ_07843	0.244053610489775	Prok-RING_2 Prok-RING_2
FFUJ_11233	0.245306947652109	adh_short
FFUJ_03516	0.245383474805131	Abhydrolase_5
FFUJ_02119	0.245536600739975	Zn_clus Fungal_trans

FFUJ_14213	0.245732400720481	Transp_cyt_pur Sm_multidrug_ex Transp_cyt_pur Sm_multidrug_ex
FFUJ_09919	0.246018719646327	
FFUJ_04420	0.246310494010599	CPSase_sm_chain GATase CPSase_sm_chain GATase
FFUJ_05996	0.246679545770268	
FFUJ_11841	0.247071412875183	MatE MatE
FFUJ_00906	0.247150203588121	
FFUJ_06585	0.247407304421686	
FFUJ_02039	0.247640640343673	
FFUJ_12655	0.249252520727916	Ank_2 Ank_2 BAR UPF0300 Ank_2
FFUJ_10198	0.249259431571	FAD_binding_3 FAD_binding_3
FFUJ_11279	0.24961905957707	Acetyltransf_7
FFUJ_10516	0.251370978289592	
FFUJ_14591	0.252250668885444	
FFUJ_10102	0.25257784447039	YhhN
FFUJ_14736	0.254010492984511	DUF1349
FFUJ_10353	0.25509738233345	
FFUJ_07466	0.255826922064253	Aldo_ket_red Aldo_ket_red
FFUJ_13116	0.256277726091944	Beta-lactamase
FFUJ_05495	0.256759577989205	
FFUJ_09139	0.256846799167367	Zn_clus Fungal_trans_2
FFUJ_14017	0.258072800110787	GST_N GST_C GST_N GST_C
FFUJ_14649	0.258645859206799	AA_permease_2
FFUJ_06505	0.259141144646296	
FFUJ_12590	0.259428700797857	adh_short CRCB
FFUJ_08543	0.260217519165807	APH MITF_TFEB_C_3_N
FFUJ_03774	0.260443078167365	
FFUJ_11213	0.260714007066152	adh_short
FFUJ_03865	0.260773649236171	Hydant_A_N Hydantoinase_A Hydantoinase_B Hydant_A_N Hydantoinase_A Hydantoinase_B
FFUJ_11757	0.261023209812098	DJ-1_PfpI
FFUJ_14098	0.261697128598258	HET Ank_4 HET HET Ank_4 HET
FFUJ_12837	0.261747924022835	Peptidase_S8
FFUJ_07252	0.262993673501531	Pyridoxal_deC ACD Pyridoxal_deC ACD
FFUJ_08170	0.263336608342852	AATase PapA_C
FFUJ_10105	0.263546602708763	Zn_clus Fungal_trans_2
FFUJ_03647	0.263581313545462	
FFUJ_14212	0.263952456908051	DIOX_N 2OG-FeII_Oxy DIOX_N 2OG-FeII_Oxy
FFUJ_04289	0.264003690091956	HTH_20 YjeF_N ABC_sub_bind HTH_20 YjeF_N ABC_sub_bind
FFUJ_03646	0.265941346722512	
FFUJ_10750	0.265978216577012	
FFUJ_04896	0.265983747496045	Acetyltransf_9 Acetyltransf_9
FFUJ_13769	0.267542501548362	
FFUJ_11937	0.267703888512358	HET
FFUJ_11143	0.267930365256276	
FFUJ_00453	0.268856824929667	Cutinase Cutinase
FFUJ_04867	0.270370564930357	Transp_cyt_pur Transp_cyt_pur
FFUJ_07816	0.270430541692079	Pkinase Pkinase Pkinase Pkinase
FFUJ_10660	0.270432416180251	
FFUJ_05270	0.2710798907038	Abhydrolase_3 Abhydrolase_3
FFUJ_09198	0.272481464635389	Cyclase
FFUJ_00025	0.273624629301519	Epimerase Epimerase
FFUJ_00057	0.274006115890364	Abhydrolase_3 Abhydrolase_3
FFUJ_00041	0.274114395422257	zf-C2H2 zf-C2H2 Fungal_trans zf-C2H2 zf-C2H2 Fungal_trans
FFUJ_02307	0.275569858206957	Ras
FFUJ_00037	0.276089896762061	HGTP_anticodon DUF2236 HGTP_anticodon DUF2236
FFUJ_12656	0.276917858198354	adh_short
FFUJ_14522	0.276988886894216	3Beta_HSD
FFUJ_03837	0.277250121935172	Glyco_hydro_47 Glyco_hydro_47
FFUJ_12573	0.277802213552718	Imm48 HD
FFUJ_03873	0.278604410096343	MFS_1 MFS_1
FFUJ_02504	0.278822714242558	bZIP_2

FFUJ_14234	0.278876833744088	NACHT NACHT
FFUJ_04057	0.279103089624943	MFS_1 MFS_1
FFUJ_06589	0.279186289616796	
FFUJ_09647	0.279936206508854	DUF4140 DUF4139
FFUJ_10218	0.279942027679146	
FFUJ_06887	0.280557814014077	Asparaginase TPP_enzyme_M Asparaginase TPP_enzyme_M
FFUJ_14616	0.280637557166342	Cyclase
FFUJ_06794	0.282082681632902	Aldedh TAXi_N Aldedh TAXi_N
FFUJ_12847	0.282098324051834	NnrS p450
FFUJ_12015	0.282149167904261	FMO-like
FFUJ_12977	0.28337217331004	Peptidase_S8 PLDc_3
FFUJ_14523	0.283637462553736	Zn_clus Fungal_trans_2 Iron_traffic
FFUJ_09104	0.284450594229437	Oxysterol_BP NDUF_B8
FFUJ_11645	0.285293740724484	DAO
FFUJ_06946	0.28611360379877	Aldo_ket_red TcpF Aldo_ket_red TcpF
FFUJ_14553	0.286435060763979	Zip Zip Zip
FFUJ_11861	0.286524418443961	IDO IDO FAD_binding_1 NAD_binding_1 Cyt-b5
FFUJ_05549	0.287104928209695	
FFUJ_14175	0.287236302198901	Amino_oxidase DUF4616 Amino_oxidase DUF4616
FFUJ_03578	0.287734476291758	
FFUJ_10191	0.2878062844934	adh_short
FFUJ_14539	0.288133637587342	PC-Esterase Cas1_AcylT
FFUJ_09397	0.288885560514677	FAD_binding_4 BBE
FFUJ_00236	0.289703696894852	Citrate_synt Citrate_synt
FFUJ_13932	0.289904573806142	MFS_1 MFS_1
FFUJ_08232	0.290177989949515	PGAP1 NACHT_sigma
FFUJ_10981	0.291825933281448	
FFUJ_10962	0.292512463073278	
FFUJ_03677	0.293442552816029	His_Phos_1 His_Phos_1
FFUJ_14753	0.293815008935809	Asp
FFUJ_11612	0.294037078994693	p450 p450
FFUJ_02315	0.294418452624904	SMP SMP Ifi-6-16
FFUJ_02750	0.295942746059042	Homeobox
FFUJ_14842	0.296279353627298	Methyltransf_3
FFUJ_12515	0.296920786384412	AA_permease_2
FFUJ_08165	0.296974301756034	
FFUJ_13870	0.29730796103165	
FFUJ_06408	0.297565670378279	
FFUJ_14549	0.297862828454946	Aminotran_3 NUC130_3NT
FFUJ_01251	0.298402184040864	
FFUJ_14845	0.298418731430254	Condensation Tri3 Condensation
FFUJ_01624	0.2991850516583	
FFUJ_12574	0.299577255334855	AAA_16 Ank_2
FFUJ_00036	0.299855637111795	Terpene_synt_C Terpene_synt_C
FFUJ_06351	0.300167565377002	
FFUJ_11356	0.300490232146561	
FFUJ_13349	0.300540224454417	Kinesin
FFUJ_02054	0.300692335519811	
FFUJ_06487	0.300711094268933	
FFUJ_07733	0.301617073079707	SSP160 DUF2207 Podoplanin Rax2 VSP SKG6 SSP160 DUF2207 Podoplanin Rax2 VSP SKG6
FFUJ_09183	0.302123435008452	Peptidase_M56 DUF2206
FFUJ_14240	0.302584501680621	
FFUJ_04796	0.302634842410342	ABC_membrane ABC_tran ABC_membrane ABC_tran ABC_membrane ABC_tran ABC_membrane ABC_tran
FFUJ_06580	0.303102992318747	
FFUJ_06096	0.304446366518596	
FFUJ_10313	0.304528677838425	
FFUJ_00635	0.30479053351622	
FFUJ_09258	0.30498707302678	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_08825	0.306725496402238	DUF3445
FFUJ_05126	0.307085010925184	Acetyltransf_1 Acetyltransf_1
FFUJ_14850	0.308014462953838	Peptidase_S8

FFUJ_10197	0.308349839395761	Oxidored_FMN
FFUJ_14120	0.30840541467712	Zn_clus Fungal_trans Fungal_trans Zn_clus Fungal_trans Fungal_trans
FFUJ_01947	0.308589311978411	
FFUJ_10557	0.30871767735632	
FFUJ_10862	0.309171662823914	
FFUJ_09375	0.309276688376989	HRXXH
FFUJ_03959	0.309371027438653	Cupin_4 Alpha_GJ PAN_1 Cupin_4 Alpha_GJ PAN_1
FFUJ_10925	0.310154723132937	
FFUJ_12413	0.311754005192338	cobW cobW CobW_C CobW_C
FFUJ_00151	0.311907467852282	Fungal_trans Fungal_trans
FFUJ_14034	0.312117250216734	DHDPS DHDPS
FFUJ_07297	0.31311618748816	DUF2457 DUF2457
FFUJ_08091	0.313187817428953	KinB_sensor DUF4047 NACHT Toxin_trans DUF1548 DUF413 ESCRT-II
FFUJ_11416	0.313613593681729	MFS_1
FFUJ_12981	0.313626636775646	DHH
FFUJ_03773	0.314852930404075	Abhydrolase_3 Abhydrolase_3
FFUJ_12602	0.315661452604648	Zn_clus Fungal_trans_2
FFUJ_14694	0.316577362177404	Glyco_hydro_32N Glyco_hydro_32C
FFUJ_11179	0.317535544638394	
FFUJ_02117	0.317788759243724	Zn_clus
FFUJ_14758	0.319378698921533	MFS_1
FFUJ_09327	0.319925967087906	TCR_zetazeta p450
FFUJ_04886	0.320900957626115	RTA1 7tm_1 DUF3339 RTA1 7tm_1 DUF3339
FFUJ_01709	0.321923544483421	
FFUJ_10710	0.322283001056461	
FFUJ_07056	0.322519880994652	2OG-FeII_Oxy_3 2OG-FeII_Oxy_3
FFUJ_14233	0.322888955689673	SNF2_N FYVE_2 zf-C3HC4 Helicase_C SNF2_N FYVE_2 zf-C3HC4 Helicase_C
FFUJ_10799	0.323148679191469	
FFUJ_07465	0.324506661633611	NMO NMO
FFUJ_14278	0.324918546313848	Polyketide_cyc2 Polyketide_cyc2
FFUJ_12839	0.326089524291472	PNP_UDP_1 NB-ARC TPR_12 TPR_12
FFUJ_11776	0.326535103669259	SIR2 SIR2
FFUJ_11994	0.326560001675947	Aminotran_4
FFUJ_10513	0.327169462337722	
FFUJ_00634	0.327280601739753	
FFUJ_04143	0.32805736145717	
FFUJ_13821	0.330316284282621	Clr5 TPR_12
FFUJ_01086	0.331435490174623	
FFUJ_14251	0.332463991772717	DUF4795 Baculo_PEP_C DUF4631 NPV_P10 Phage_Mu_Gam DUF4795 Baculo_PEP_C DUF4631 NPV_P10 Phage_Mu_Gam
FFUJ_06782	0.333410166166034	ADH_N ADH_zinc_N ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_12483	0.33453753616777	Methyltransf_23
FFUJ_03841	0.335189764485793	2OG-FeII_Oxy_3 GTP_cyclohydrol 2OG-FeII_Oxy_3 GTP_cyclohydrol
FFUJ_06415	0.337544589668385	
FFUJ_11770	0.337596066570944	Glyco_transf_34
FFUJ_10125	0.337848885251686	
FFUJ_06272	0.33816986286271	
FFUJ_09998	0.338509915877647	DUF630 Pkinase
FFUJ_09261	0.339050011829838	MFS_1
FFUJ_00117	0.339513300841155	
FFUJ_14708	0.339963083944514	HLH
FFUJ_10332	0.340151651784293	
FFUJ_02112	0.340885703435717	ADH_N PALP ADH_zinc_N
FFUJ_12024	0.341088968222673	Aminotran_5
FFUJ_08867	0.341960122284662	
FFUJ_04597	0.342007531309655	Galactosyl_T Galactosyl_T
FFUJ_11137	0.342185373699299	
FFUJ_05591	0.342541335958422	
FFUJ_01159	0.344357737750794	

FFUJ_10325	0.344644285620213	
FFUJ_08241	0.34486413378853	MaoC_dehydrat_N
FFUJ_12124	0.345172635359432	AA_permease_2
FFUJ_10699	0.345558051632146	
FFUJ_04949	0.346503060455774	Methyltransf_23 Methyltransf_23
FFUJ_03717	0.346531882968781	Fungal_trans_2 Fungal_trans_2
FFUJ_10493	0.346599144823044	
FFUJ_14713	0.34700780071967	bZIP_1
FFUJ_05189	0.347183430209411	RTA1 RTA1
FFUJ_06453	0.347265260584884	
FFUJ_14930	0.347445836970283	Zn_clus Fungal_trans_2
FFUJ_08090	0.347578319328127	SNF2_N DZR Helicase_C
FFUJ_09322	0.347961597957775	DUF2785 Amidohydro_3
FFUJ_11637	0.348108754112196	Abhydrolase_5
FFUJ_11230	0.349077675368271	p450 p450
FFUJ_10162	0.349438385292535	EF-hand_5 PAD
FFUJ_14797	0.349530438063153	adh_short
FFUJ_00059	0.349809166581642	Ala_racemase_N SDH_alpha D-ser_dehydrat Ala_racemase_N SDH_alpha D-ser_dehydrat
FFUJ_12513	0.3498746394022	Zn_clus Fungal_trans_2
FFUJ_06555	0.349981362108507	
FFUJ_08129	0.350211897167346	AIM24
FFUJ_06789	0.35021675216878	HeLo HeLo
FFUJ_07109	0.351016316779331	HET HET HET HET
FFUJ_11294	0.351023616034332	Methyltransf_2
FFUJ_09334	0.352713817670863	Sugar_tr
FFUJ_02284	0.353592603093375	HET
FFUJ_14658	0.353629368762029	
FFUJ_09999	0.354608740068132	SMP_LBD C2
FFUJ_10007	0.354611198037135	Peptidase_S10 Toxin_trans
FFUJ_14505	0.355393696967257	APH DUF3622
FFUJ_03922	0.355588358969355	Glyco_hydro_3 Glyco_hydro_3_C Glyco_hydro_3 Glyco_hydro_3_C
FFUJ_06051	0.356103865173427	
FFUJ_10769	0.356254464767407	
FFUJ_02076	0.356279159301026	
FFUJ_10971	0.356543497982006	
FFUJ_14552	0.357000994921266	
FFUJ_08088	0.35715444951707	GPI-anchored
FFUJ_09069	0.35785821408662	
FFUJ_12664	0.358265244787078	Abhydrolase_5
FFUJ_12118	0.359793243545869	PALP Rhodanese
FFUJ_09841	0.360259904607411	Aldolase_II
FFUJ_11417	0.360294866142928	
FFUJ_11582	0.360592176214515	COesterase YppG
FFUJ_06575	0.360674666987156	
FFUJ_00115	0.361042355202878	SnoaL_4 SnoaL_4
FFUJ_03613	0.361069884356324	PAN_1
FFUJ_11432	0.361250127021149	DUF3040
FFUJ_00940	0.361630934843055	
FFUJ_11995	0.36242892379879	DUF4699 zf-C2H2_4 HTH_Tnp_Tc5
FFUJ_09657	0.362446509386484	
FFUJ_12117	0.363684664996051	MFS_1
FFUJ_07776	0.363692227684687	NAAA-beta AAT NAAA-beta AAT
FFUJ_07055	0.363692227684687	AA_permease AA_permease
FFUJ_09114	0.363840992524717	Amidase
FFUJ_01711	0.364257352914465	
FFUJ_06414	0.365078850733567	
FFUJ_00261	0.365478894086019	GMC_oxred_N GMC_oxred_C GMC_oxred_N GMC_oxred_C
FFUJ_14600	0.365800765681057	VWA_2 Alpha_kinase
FFUJ_07416	0.366694364642227	Glyoxalase_2 Glyoxalase_2
FFUJ_01944	0.367144527233377	
FFUJ_03846	0.367582502795137	Sulfotransfer_3 GAS2 Sulfotransfer_3 GAS2

FFUJ_10923	0.367597790439559	
FFUJ_05640	0.367755800000185	
FFUJ_13814	0.369106743330669	CFEM Serglycin DUF2708
FFUJ_13653	0.369885333059374	DnaJ RPT zf-C3HC zf-C2H2_jaz zf-C2H2
FFUJ_00814	0.370018677276379	
FFUJ_02075	0.370318877549868	
FFUJ_10451	0.370950862504077	
FFUJ_12735	0.371298141746821	FAT DUF4158 CHAT
FFUJ_13339	0.372099407925275	ABC_membrane RAMP4 ABC_tran ABC_membrane ABC_tran
FFUJ_05290	0.372589778103603	CENP-F_N CENP-F_N
FFUJ_04388	0.372667264025956	Tyrosinase Tyrosinase
FFUJ_08984	0.373595763400423	Allexi_40kDa NPV_P10
FFUJ_05840	0.374729120468083	
FFUJ_14590	0.374799257487939	MFS_1 PepSY_TM
FFUJ_14588	0.375147539213061	AMP-binding PP-binding NAD_binding_4
FFUJ_02041	0.375376437580486	
FFUJ_03290	0.375845073885076	
FFUJ_14601	0.376455175863869	Ank_2 Ank_2 Ank_2
FFUJ_14648	0.376463004110574	Aldedh
FFUJ_11556	0.376481270652611	APH
FFUJ_00563	0.376606550819496	
FFUJ_14573	0.376656152401725	MFS_1 MFS_1
FFUJ_02283	0.37769929604452	HET Lbh
FFUJ_07222	0.377735949991253	DUF2890 DUF2890
FFUJ_02123	0.377764752016222	zf-C3HC4 IBR IBR
FFUJ_11110	0.379968045183219	
FFUJ_14116	0.380033894333254	Zn_clus Fungal_trans Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_04585	0.380497795424625	Amidoligase_2 Amidoligase_2
FFUJ_07442	0.380503070280669	EspA EspA
FFUJ_14108	0.380605944590756	
FFUJ_05308	0.380898892963083	MFS_1 MFS_1
FFUJ_11352	0.380999233394753	InvH Methyltransf_23
FFUJ_10194	0.381638863985629	Amidase
FFUJ_09501	0.382253071721393	ADP_ribosyl_GH
FFUJ_10908	0.382534030021104	
FFUJ_11138	0.383269207677031	
FFUJ_13812	0.384202816443795	GFO_IDH_MocA GFO_IDH_MocA_C
FFUJ_02293	0.384250755072117	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_11659	0.384322674230159	MFS_1
FFUJ_09685	0.384874501829255	UDPG_MGDP_dh_N UDPG_MGDP_dh_N UDPG_MGDP_dh UDP G_MGDP_dh_C UDPG_MGDP_dh_C
FFUJ_13131	0.385213454835292	
FFUJ_01907	0.385812020945883	
FFUJ_12514	0.386392768792904	PhyH
FFUJ_01950	0.38674110088461	
FFUJ_13035	0.387610618851453	ECH_1 UPF0444
FFUJ_06500	0.387822927228738	
FFUJ_10954	0.387900892391352	
FFUJ_05143	0.38849824862538	MFS_1 MFS_1
FFUJ_05477	0.389217909222358	
FFUJ_09071	0.389641702690613	F-box-like
FFUJ_00368	0.389752450836181	CLN3 CLN3
FFUJ_12974	0.389833506007087	HET
FFUJ_02287	0.390506914839342	Fer2 Fer2_2 FAD_binding_5 YjcZ CO_deh_flav_C Ald_Xan_dh_ C Ald_Xan_dh_C2
FFUJ_12901	0.390544811705461	PNP_UDP_1 NACHT Ank_2 Ank_4 Ank_2 Ank_3
FFUJ_13974	0.391073043432291	Arginase Arginase
FFUJ_11156	0.391656280945508	
FFUJ_12995	0.391783895191447	DUF4419
FFUJ_04482	0.391998489423362	DUF1774 DUF1774
FFUJ_09161	0.392330119053394	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_01429	0.393005116488522	
FFUJ_05207	0.393550315080955	Cyclase Cyclase



FFUJ_08722	0.393591235451902	ABC_tran ABC2_membrane PDR_CDR
FFUJ_02435	0.395119238914442	CHAT NACHT
FFUJ_13099	0.395823726982675	zf-met PHD zf-Di19 Zn-ribbon_8 Molybdop_Fe4S4 zf-C2H2_8
FFUJ_07480	0.396925457456851	Rib_recp_KP_reg Rib_recp_KP_reg
FFUJ_13238	0.397008004367645	
FFUJ_02098	0.397779270507763	Macoilin HLH
FFUJ_11175	0.397784784937583	
FFUJ_14737	0.398115790662489	HET
FFUJ_01741	0.398438786436964	
FFUJ_10851	0.398844973119503	
FFUJ_06132	0.398856031603549	
FFUJ_06759	0.399176861050997	HET HET
FFUJ_04850	0.399270946164449	MFS_1 MFS_1
FFUJ_03905	0.399558873603386	adh_short adh_short
FFUJ_09209	0.399603188557756	Sporozoite_P67
FFUJ_04324	0.399730621431322	PFK TgMIC1 UVR PFK PFK TgMIC1 UVR PFK
FFUJ_09810	0.400010562284957	Asp Sirohm_synth_M
FFUJ_10520	0.400204695713622	
FFUJ_10412	0.400421126805659	
FFUJ_08078	0.400768215617568	Zn_clus
FFUJ_12562	0.401123946340584	Amidohydro_3
FFUJ_09009	0.40138816936096	Pyridox_ox_2
FFUJ_01409	0.401705466735514	
FFUJ_07973	0.401741665697936	Sugar_tr TPR_14 Sugar_tr TPR_14
FFUJ_08361	0.402184670875587	PARP UQ_con
FFUJ_13001	0.402396594300171	DDHD
FFUJ_12736	0.403262176130214	
FFUJ_02044	0.403955981987457	
FFUJ_01066	0.404982086485907	
FFUJ_09958	0.405187058238865	Cerato-platanin
FFUJ_06755	0.405386513843914	Transp_cyt_pur Transp_cyt_pur
FFUJ_11412	0.405988284037852	
FFUJ_03866	0.406354281436377	Fungal_trans Fungal_trans
FFUJ_09778	0.406776996137653	MFS_1 DUF3040 DUF2583
FFUJ_09134	0.406808012516157	
FFUJ_00116	0.406870052368258	Transferase Transferase
FFUJ_14816	0.407880940662615	Pyr_redox_3 Ribosomal_L31e HCV_core
FFUJ_11993	0.407926178614937	AATase
FFUJ_00958	0.408027982353114	
FFUJ_14372	0.408141127415849	MFS_1 MFS_1
FFUJ_03764	0.408149614560243	AAA AAA
FFUJ_11295	0.409010560894639	
FFUJ_08677	0.409288489707044	Glyco_transf_22
FFUJ_07852	0.409325371999883	
FFUJ_02578	0.411062593948262	VHL DPPIV_N Peptidase_S9
FFUJ_04911	0.411664229511865	DUF3060 DUF3060
FFUJ_10945	0.411849744835304	
FFUJ_10969	0.412226740962184	
FFUJ_12789	0.412844388231927	Methyltransf_23
FFUJ_02876	0.413196517484364	Amidoligase_2 TMEM232 Amidoligase_2
FFUJ_00011	0.413477290717073	Aminotran_4 Aminotran_4
FFUJ_14637	0.413761122703022	GST_N_2 GST_C_2
FFUJ_03576	0.413847170856005	adh_short Flavin_Reduct
FFUJ_06615	0.41385864529506	
FFUJ_08432	0.414096811709612	Ribonuc_L-PSP Peptidase_M18
FFUJ_02986	0.41417718791962	AAA_19 UvrD-helicase UvrD_C_2 PDDEXK_3
FFUJ_01949	0.4142403516005	
FFUJ_05500	0.414450009197335	
FFUJ_10006	0.416226290675076	Med26
FFUJ_12933	0.41719969260929	Lipase_GDSL
FFUJ_13072	0.41732984426224	NMO
FFUJ_09448	0.417347200883453	HET

FFUJ_11431	0.417668428612373	F-box-like
FFUJ_04577	0.417763976418612	Beta_elim_lyase Beta_elim_lyase
FFUJ_08935	0.418085524935256	Arf
FFUJ_12137	0.418178269557493	
FFUJ_09519	0.418334822762354	Cutinase CCDC24
FFUJ_11226	0.418360920660645	Zn_clus
FFUJ_02980	0.419069084433117	Glyco_hydro_16 Pentapeptide_2 Pentapeptide_2
FFUJ_14515	0.420220951723934	HAD_2
FFUJ_05294	0.420378269646771	
FFUJ_01373	0.420701830357278	
FFUJ_10234	0.420768905609974	
FFUJ_06213	0.420929346319838	
FFUJ_10199	0.421227052857614	zf-C2H2 FOXp-CC zf-C2H2 Fungal_trans
FFUJ_11206	0.421422719759317	Zn_clus Gal4_dimer Fungal_trans
FFUJ_10195	0.421636012535684	FAD_binding_3 Phe_hydrox_dim
FFUJ_03807	0.422396562769673	CDH-cyt GMC_oxred_N GMC_oxred_C CDH-cyt GMC_oxred_N GMC_oxred_C
FFUJ_06112	0.423663280852795	
FFUJ_11252	0.4243274748306	Amidohydro_1 Ntox43
FFUJ_13130	0.425187179020371	NmrA Cas_Cas02710 SpoU_sub_bind
FFUJ_09726	0.425266760136406	Mito_carr V-ATPase_G_2 APG6 Spc24 EMP24_GP25L DUF948 IncA DUF972 FlaC_arch
FFUJ_06049	0.425423018238322	
FFUJ_02245	0.425924611007839	Acetyltransf_2
FFUJ_02328	0.425924611007839	Choline_kinase
FFUJ_02717	0.426509564638029	
FFUJ_08300	0.426713600819016	KxDL XylR_N
FFUJ_11142	0.427361840677301	
FFUJ_10838	0.427930970641991	
FFUJ_09297	0.428352377183667	
FFUJ_11690	0.429377946733522	PC-Esterase Cas1_AcylT
FFUJ_08065	0.429428545473854	p450
FFUJ_09481	0.429964662785676	HlyIII
FFUJ_01800	0.430095815453692	
FFUJ_14799	0.430713366165989	HET
FFUJ_11586	0.431233152648381	GFA GFA
FFUJ_10770	0.431239130850697	
FFUJ_12098	0.431511226746618	Fungal_trans
FFUJ_10404	0.431571051051267	
FFUJ_09118	0.431690724543668	AA_permease ABC_trans_CmpB
FFUJ_06338	0.431774515732958	
FFUJ_10944	0.432835279460761	
FFUJ_09324	0.433012326607241	PBP
FFUJ_06852	0.433297554716506	DUF4574 NACHT DUF4574 NACHT
FFUJ_07718	0.43330356153771	
FFUJ_10836	0.433543902681871	
FFUJ_02011	0.43356193364084	
FFUJ_06077	0.433564938873574	
FFUJ_14610	0.433718233367802	ADH_N ADH_zinc_N DUF3799
FFUJ_02542	0.433937749216897	CENP-F_leu_zip Spc7 Prefoldin TFR_dimer
FFUJ_11878	0.434250676030107	
FFUJ_14312	0.434633113867153	HgmA HgmA
FFUJ_10161	0.434648177364055	Sugar_tr
FFUJ_02053	0.434868163881502	
FFUJ_03541	0.435900269268422	Epimerase
FFUJ_06299	0.436362793337225	
FFUJ_10887	0.436756173278109	
FFUJ_11430	0.436995400455869	Pro-kuma_activ Peptidase_S8
FFUJ_11814	0.437107488616575	adh_short
FFUJ_12910	0.437298407587751	Citrate_synt
FFUJ_06172	0.437519735454242	
FFUJ_14049	0.437641058500838	Peptidase_S10 Peptidase_S10

FFUJ_02037	0.437880770362291	
FFUJ_00296	0.4383210895406	Nucleocapsid-N Nucleocapsid-N
FFUJ_10369	0.43844263480053	
FFUJ_12542	0.438460869496276	
FFUJ_10955	0.438515578133893	
FFUJ_10967	0.438926110560959	
FFUJ_10822	0.439391845282575	
FFUJ_02789	0.439474085046964	
FFUJ_12555	0.440285122294011	SEEK1 Acetyltransf_1
FFUJ_14868	0.440590410477771	MOSC_N MOSC
FFUJ_06377	0.440593464428363	
FFUJ_14609	0.440782850712882	Ank_2 Ank_4
FFUJ_05723	0.440950922812606	
FFUJ_10874	0.441452463802627	
FFUJ_02356	0.441501425162473	DUF3245 PBP1_TM
FFUJ_12554	0.441752437374775	DUF3324 CBM_4_9
FFUJ_07764	0.442067935425131	Glyco_hydro_2_N Glyco_hydro_2 Glyco_hydro_2_C Glyco_hydro_2_N Glyco_hydro_2 Glyco_hydro_2_C
FFUJ_02334	0.443187777643202	Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_00467	0.443322963774763	Hemerythrin Hemerythrin
FFUJ_13987	0.444492197593101	CorA EMP70 CorA EMP70
FFUJ_02014	0.444655519803119	
FFUJ_09956	0.445081055465699	Yop-YscD_cpl
FFUJ_07439	0.445352624158862	HAD_2 HAD_2
FFUJ_03900	0.445528615025032	PAN_3 PAN_3
FFUJ_11180	0.445726301688248	
FFUJ_01712	0.445849900393601	
FFUJ_06882	0.445849900393601	Thioredoxin Thioredoxin_6 Thioredoxin Thioredoxin Thioredoxin_6 Thioredoxin
FFUJ_10700	0.446394141995375	
FFUJ_10757	0.44648697669954	
FFUJ_11965	0.446604595040797	Fungal_trans_2
FFUJ_14765	0.447019601782943	Lipase_GDSL
FFUJ_14543	0.44710946742393	Helo_like_N Lectin_N Ank_4
FFUJ_11153	0.447310956043819	
FFUJ_04481	0.448183052119601	
FFUJ_03302	0.44845029662909	
FFUJ_08750	0.449505290218348	AdoHcyase AdoHcyase_NAD
FFUJ_14300	0.449555144714747	
FFUJ_03282	0.449876215431476	Zn_clus
FFUJ_12586	0.450722070087846	Glyco_hydro_15 CBM_20 Kelch_2
FFUJ_14369	0.451184684098882	Cu_amine_oxidN2 Cu_amine_oxidN3 Cu_amine_oxid Cu_amine_oxidN2 Cu_amine_oxidN3 Cu_amine_oxid
FFUJ_02040	0.45123472485635	
FFUJ_05842	0.451591425936336	
FFUJ_02325	0.451854438729536	NmrA
FFUJ_03854	0.452001667476471	
FFUJ_02985	0.452478140030015	MMM1 SMP_LBD C2 C2 C2 PDCD2_C C2 C2
FFUJ_00023	0.452986512396048	
FFUJ_05519	0.453398021281808	
FFUJ_12481	0.453589767467666	DAO Sigma70_r4_2
FFUJ_09330	0.454159196682793	ApbA ApbA_C
FFUJ_06374	0.45430402738772	
FFUJ_07458	0.454508758215756	Anp1 AAA_12 Anp1 AAA_12
FFUJ_11818	0.454530811653272	Polysacc_deac_1
FFUJ_09493	0.454956337328045	
FFUJ_11991	0.455808584164901	ADH_N Coiled-coil_56 ADH_zinc_N
FFUJ_10470	0.455871777031994	
FFUJ_06860	0.455950780436156	p450 p450 p450 p450
FFUJ_06400	0.456007671364751	
FFUJ_09686	0.457127969992293	Glyco_trans_4_4 Glycos_transf_1
FFUJ_03381	0.459201735615839	Pectate_lyase_3 Pectate_lyase_3
FFUJ_01337	0.459294050266357	

FFUJ_10411	0.461243344787204	
FFUJ_03542	0.461601558481178	Zn_clus
FFUJ_14265	0.461982465358552	
FFUJ_05560	0.462004881431398	
FFUJ_06818	0.462568843151419	MFS_1 PIRT MFS_1 PIRT
FFUJ_10719	0.462594494125764	
FFUJ_05064	0.462806168946037	
FFUJ_10294	0.462876748741393	
FFUJ_08999	0.463284397116811	
FFUJ_07324	0.463605632709381	TfoX_N PTCB-BRCT TfoX_N PTCB-BRCT
FFUJ_06432	0.463772763234892	
FFUJ_01353	0.46420372347512	
FFUJ_02286	0.464219811829015	HET
FFUJ_14592	0.46434853873502	Abhydrolase_6 Lipase3_N
FFUJ_00888	0.464741376305219	
FFUJ_04824	0.465066845735448	HMA E1-E2_ATPase Hydrolase HMA E1-E2_ATPase Hydrolase
FFUJ_06431	0.465599043638179	
FFUJ_02271	0.465753979169998	SurE
FFUJ_10593	0.466927349612591	
FFUJ_10269	0.467212247944208	
FFUJ_04463	0.467659370412366	Methyltransf_23 Methyltransf_23
FFUJ_10763	0.4677177222718	
FFUJ_05423	0.46825619939084	
FFUJ_06517	0.468366566353314	
FFUJ_12650	0.46856464287431	Sugar_tr
FFUJ_03577	0.468691325858316	
FFUJ_05535	0.46894479458712	
FFUJ_00641	0.469393575103701	
FFUJ_00225	0.470109910576336	Glyco_hydro_88 Glyco_hydro_88
FFUJ_06000	0.470765336320084	
FFUJ_02703	0.470830602777021	POT1 POT1PC
FFUJ_10486	0.471068902141902	
FFUJ_12987	0.471356327464938	RLL Ank_2 Ank_4 Ank_4 Ank_4 Ank_5 Ank_4 Ank_2 ZZ
FFUJ_00195	0.471738744102545	Ank_4 Ank_2 Ank_2 Ank_2 Ank_2 Ank_4 Ank_4 Ank_2 Ank_2 Ank_2 Ank_2 Ank_4
FFUJ_11729	0.471918619796697	SSF
FFUJ_03593	0.472550362754429	
FFUJ_07134	0.473146874385283	Amidase Amidase
FFUJ_01910	0.473474948495941	
FFUJ_00303	0.473717869782246	Helo_like_N LIM LIM MSP Helo_like_N LIM LIM MSP
FFUJ_14039	0.474299416935128	Zn_clus SKA2 Zn_clus SKA2
FFUJ_09401	0.474322430644691	Macro DUF2793
FFUJ_06714	0.474631580088354	Zn_clus Fungal_trans Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_11964	0.474957391510154	Zn_clus
FFUJ_09145	0.475092388996229	PAN_1 PAN_1 Glyoxal_oxid_N Kelch_6 Kelch_1 Glyoxal_oxid_N Kelch_6 DUF1929
FFUJ_12927	0.477860028232935	AATase
FFUJ_05797	0.477929591035192	
FFUJ_11439	0.479811619294399	TRAM1 TRAM_LAG1_CLN8
FFUJ_02884	0.480290773686674	PTS_2-RNA
FFUJ_03154	0.48032406606005	DIOX_N 2OG-FeII_Oxy
FFUJ_11798	0.480397317404915	DAO
FFUJ_09298	0.480750412313677	Zn_clus Fungal_trans_2
FFUJ_04352	0.481220497410077	Methyltransf_6 Methyltransf_6
FFUJ_09068	0.481247182680424	FAD_binding_4 BBE
FFUJ_02180	0.481403988531156	Methyltransf_23
FFUJ_05248	0.481444032254588	G-alpha G-alpha
FFUJ_08858	0.483095393065604	
FFUJ_14661	0.483591234543825	PLAC8
FFUJ_06266	0.48368845228572	
FFUJ_06050	0.483812517090325	
FFUJ_13787	0.484809542247652	Sod_Fe_N Sod_Fe_C

FFUJ_06830	0.484964147303042	Fe-ADH SPO22 Fe-ADH SPO22
FFUJ_04387	0.48641512669872	DHDPS DHDPS
FFUJ_07425	0.486472446812333	adh_short adh_short
FFUJ_04576	0.486634328303053	p450 p450
FFUJ_06253	0.486890750839372	
FFUJ_01863	0.487194583856034	
FFUJ_10005	0.48787044732502	DUF1103
FFUJ_13998	0.488113987629334	Amidohydro_3 Amidohydro_3
FFUJ_12360	0.489747488749942	NAD_binding_2 NAD_binding_11 SPAM
FFUJ_12504	0.48982896762882	NACHT WD40 WD40 WD40 WD40 WD40
FFUJ_14607	0.490175404120669	Fumble
FFUJ_00367	0.490328321632861	
FFUJ_05837	0.490794164263	
FFUJ_09182	0.49098811235131	Auxin_canalis
FFUJ_08132	0.491376238486752	ADH_N ADH_zinc_N
FFUJ_11519	0.491519309654117	Zn_clus Fungal_trans_2
FFUJ_06283	0.491959003041455	
FFUJ_02826	0.492102243888993	MFS_1
FFUJ_11049	0.492160234183663	
FFUJ_06967	0.492525388820803	C1_1 WW WW C1_1 WW WW
FFUJ_06389	0.492877148736033	
FFUJ_06610	0.493362511257021	
FFUJ_12027	0.494009263458433	Abhydrolase_6
FFUJ_11482	0.494029809153354	
FFUJ_00018	0.494211333240126	adh_short adh_short
FFUJ_05076	0.494766594063959	PALP DUF212 PALP DUF212
FFUJ_12844	0.494989559233495	
FFUJ_00259	0.495398017402399	Zn_clus Fungal_trans Zn_clus Fungal_trans
FFUJ_01121	0.495487305219949	
FFUJ_07104	0.495645315398365	Pro-kuma_activ Peptidase_S8 Pro-kuma_activ Peptidase_S8
FFUJ_13118	0.49611620950575	Clr5 Ank_2 Ank_2 Ank_2 Ank_2 Ank_2 Ank_2 Ank_2
FFUJ_00829	0.49617467281401	
FFUJ_14068	0.496209066213533	Zn_clus DUF2797 Fungal_trans Zn_clus DUF2797 Fungal_trans
FFUJ_09641	0.496587550992044	
FFUJ_11589	0.497228191242451	Beta-lactamase dDENN Borrelia_orfD DUF3471
FFUJ_11313	0.497300573497296	Zn_clus Fungal_trans_2
FFUJ_11264	0.498598345274727	AAA
FFUJ_08089	0.499182754945085	
FFUJ_09496	0.499864854567371	DPBB_1 Pollen_allerg_1
tRNA- Trp(CCA)	1	
tRNA- Leu(AAG)	1	

**Anexo 2.1: Categorías funcionales asignadas a los genes inducidos por luz**

Id. GO	Termino asignado a GO	Clasif.Fisher
GO:0006082	procesos metabólicos de ácidos orgánicos	3.8e-05
GO:0050896	Respuesta a estímulos	8.5e-05
GO:0051716	Respuesta celular a estímulos	0.00016
GO:0044281	Procesos metabólicos de moléculas pequeñas	0.00021
GO:0000160	Sistema de traducción de señales con fosfato	0.00024
GO:0043436	Procesos metabólicos de oxoácidos	0.00033
GO:0044710	Procesos metabólicos unicelulares	0.00093
GO:0035556	Transducción intracelular	0.00123
GO:0007165	Transducción de señales	0.00203
GO:0044700	Señalización unicelular	0.00203
GO:0023052	Señalización	0.00226
GO:0007154	Comunicación celular	0.00250
GO:0006950	Respuesta a estrés	0.01031
GO:0009605	Respuesta a estímulos externos	0.01364
GO:0006952	Respuesta de defensa	0.01756
GO:0019048	Modulación por virus de la morfología o fisiología del hospedador	0.01756
GO:0048585	Regulación negativa de respuesta a estímulos	0.02205
GO:0006974	Respuesta celular de estímulos de daño a ADN	0.02589
GO:0050789	Regulación de procesos biológicos	0.03008
GO:1901564	Procesos metabólicos de compuestos organonitrogenados	0.03357
GO:0033554	Respuesta celular a estrés	0.03386
GO:0006807	Procesos metabólicos de compuestos nitrogenados	0.03669
GO:0035821	Modificación de la fisiología o morfología de otros organismos	0.03890
GO:0044003	modificación de morfología o la fisiología de simbiontes	0.03890
GO:0051817	modificación de morfología o la fisiología de otro organismo involucrado en la interacción simbiótica	0.03890
GO:0016032	Procesos virales	0.04083
GO:0065007	Regulación viológica	0.04253
GO:0048583	Regulación de respuesta a estímulos	0.04562
GO:0051701	Interacción con hospedador	0.04562
GO:0006281	Reparación de ADN	0.05289
GO:0044763	Procesos celulares unicelulares	0.05680
GO:0044403	simbiosis , mutualismo a través de parasitismo	0.06289
GO:0044419	interacción entre especies	0.06289
GO:0050794	Regyñacion de procesos celulares	0.08015
GO:0006732	Procesos metabólicos coenzimáticos	0.08116
GO:0051704	Procesos multi-organismo	0.08315
GO:0044711	Procesos biosintéticos unicelulares	0.09291
GO:0051186	Procesos metabólicos cofactor	0.09616

GO:0051188	Procesos biosintéticos cofactor	0.09616
GO:0071704	Procesos metabólicos de sustancias orgánicas	0.09671
GO:0044764	Procesos celulares multi-organismos	0.10317
GO:0055086	proceso metabólico de pequeñas molécula que contienen nucleobases	0.11189
GO:0009058	Procesos biosintéticos	0.12378
GO:0008152	Procesos metabólicos	0.12908
GO:0048519	Regulación negativa de procesos biológicos	0.13359
GO:0044699	Procesos uni-organismo	0.17969
GO:0044237	Procesos metabólicos celulares	0.19104
GO:0009987	Procesos celulares	0.20738
GO:0065008	Regulación de la calidad biológica	0.22119
GO:0019219	Regulación de procesos metabólicos de compuestos que contienen nucleobases	0.26427
GO:0051252	Procesos metabólicos re regulación de ARN	0.26427
GO:2001141	Procesos biosintéticos de regulación de ARN	0.26427
GO:0009889	Regulación de procesos biosintéticos	0.27530
GO:0010468	Regulación de expresión génica	0.27530
GO:0010556	Regulación de procesos de biosíntesis de macromoléculas	0.27530
GO:0031326	Regulación de procesos de biosíntesis celular	0.27530
GO:0051171	Regulación de procesos metabólicos de compuestos de nitrógeno	0.27530
GO:1901566	Procesos biosintéticos de compuestos organonitrogenados	0.28951
GO:0019637	Procesos metabólicos organofosfato	0.30787
GO:0006793	Procesos metabólicos de fosforo	0.32615
GO:0006796	Procesos metabólicos de compuestos que contiene fosfatos	0.32615
GO:1901576	Procesos biosintéticos de sustancias orgánicas	0.33212
GO:0034641	Procesos metabólicos de compuestos celulares de nitrógeno	0.38975
GO:0007186	G-protein coupled receptor signaling pathway	0.39270
GO:0008277	Regulación de ruta de señalización de proteínas receptoras acoplado a proteína G	0.39270
GO:0010941	Regulación de muerte celular	0.39270
GO:0023021	Terminación de la transducción de señales	0.39270
GO:0038032	Terminación de la ruta de señalización de receptor de proteína G	0.39270
GO:0042981	Regulación de apoptosis	0.39270
GO:0043067	Regulación de la muerte celular programada	0.39270
GO:0045744	Regulación negativa de la ruta de señalización de proteínas receptoras acopladas a proteína G	0.39270
GO:0009968	Regulación negativa de la transducción de señales	0.42236
GO:0010648	Regulación negativa de la comunicación celular	0.42236
GO:0019058	Ciclo de vida viral	0.42236
GO:0023057	Regulación negativa de la señalización	0.42236
GO:0034508	Ensamblamiento del complejo centromérico	0.42236
GO:0044271	Procesos de biosíntesis celular de compuestos de nitrógeno	0.43593

GO:0044249	Procesos de biosíntesis celular	0.43680
GO:0080090	Procesos metabólicos de regulación primaria	0.44460
GO:0006915	Procesos de apoptosis	0.45058
GO:0008610	Procesos de biosíntesis de lípidos	0.45058
GO:0012501	Muerte celular programada	0.45058
GO:0060255	Regulación de procesos metabólicos de macromoléculas	0.45571
GO:0018130	Procesos de biosíntesis heterociclo	0.47524
GO:1901362	Procesos de biosíntesis de compuestos cíclicos orgánicos	0.47524
GO:0044238	Procesos de metabolismo primario	0.47590
GO:0009966	Regulación de transducción de señales	0.47745
GO:0010646	Regulación de la comunicación celular	0.47745
GO:0065004	Ensamblaje del complejo ADN-proteína	0.47745
GO:0071824	Organización de la subunidad del complejo ADN-proteína	0.47745
GO:0090407	Procesos biosintéticos de organosfosfatos	0.47745
GO:0006355	Regulación de la transcripción	0.48022
GO:1903506	Regulación de la transcripción de ácidos nucleicos	0.48022
GO:2000112	Regulación de la biosíntesis de procesos metabólicos de macromoléculas	0.49292

## Anexo 2.2: Categorías funcionales asignadas a los genes inducidos por la mutación carS

GO.ID	Termino asignado a GO	Clasif. Fisher
GO:0006082	procesos metabólicos de ácidos orgánicos	0.00078
GO:0043436	Procesos metabólicos de oxoácidos	0.00516
GO:0050896	Respuesta a estímulos	0.00720
GO:0006950	Respuesta a estrés	0.00765
GO:0044710	Procesos metabólicos unicelulares	0.00767
GO:0044281	Procesos metabólicos de moléculas pequeñas	0.01072
GO:0006952	Respuesta de defensa	0.02323
GO:0044711	Procesos biosintéticos unicelulares	0.04037
GO:0044763	Procesos celulares unicelulares	0.04455
GO:0051716	Respuesta celular a estímulos	0.07878
GO:0044699	Procesos uni-organismo	0.08140
GO:0000160	Sistema de traducción de señales con fosfato	0.08844
GO:0009605	Respuesta a estímulos externos	0.11484
GO:0006629	Procesos del metabolismo de lípidos	0.12688
GO:0051704	Procesos multi-organismo	0.12710
GO:0008610	Procesos de biosíntesis de lípidos	0.13316
GO:0019048	Modulación por virus de la morfología o fisiología del hospedador	0.13316
GO:0006974	Respuesta celular de estímulos de daño a ADN	0.13493
GO:0044764	Procesos celulares multi-organismos	0.14337
GO:0048585	Regulación negativa de respuesta a estímulos	0.15209
GO:0033554	Respuesta celular a estrés	0.16079
GO:0016032	Procesos virales	0.16442



GO:0055085	Transporte transmembrana	0.19290
GO:0007165	Transducción de señales	0.19480
GO:0044700	Señalización unicelular	0.19480
GO:0023052	Señalización	0.20336
GO:0035821	Modificación de la fisiología o morfología de otros organismos	0.21142
GO:0044003	modificación de morfología o la fisiología de simbiosis	0.21142
GO:0044255	Procesos metabólicos de lípidos celulares	0.21142
GO:0051817	modificación de morfología o la fisiología de otro organismo involucrado en la interacción simbiótica	0.21142
GO:0007154	Comunicación celular	0.21207
GO:0044403	simbiosis , mutualismo a través de parasitismo	0.22032
GO:0044419	interacción entre especies	0.22032
GO:0048583	Regulación de respuesta a estímulos	0.23171
GO:0051701	Interacción con hospedador	0.23171
GO:0035556	Transducción intracelular	0.23208
GO:0006281	Reparación de ADN	0.25214
GO:1901564	Procesos metabólicos de compuestos organonitrogenados	0.33578
GO:0048519	Regulación negativa de procesos biológicos	0.38113
GO:0050789	Regulación de procesos biológicos	0.40982
GO:0007186	G-protein coupled receptor signaling pathway	0.42589
GO:0008277	Regulación de ruta de señalización de proteínas receptoras acopladas a proteína G	0.42589
GO:0010941	Regulación de muerte celular	0.42589
GO:0023021	terminación de la transducción de señales	0.42589
GO:0038032	terminación de la ruta de señalización de receptor de proteína G	0.42589
GO:0042981	Regulación de apoptosis	0.42589
GO:0043067	regulación de la muerte celular programada	0.42589
GO:0045744	regulación negativa de la ruta de señalización de proteínas receptoras acopladas a proteína G	0.42589
GO:0009968	regulación negativa de la transducción de señales	0.45700
GO:0010648	regulación negativa de la comunicación celular	0.45700
GO:0019058	Ciclo de vida viral	0.45700
GO:0023057	Regulación negativa de la señalización	0.45700
GO:0010506	Regulación de autofagia	0.46906
GO:0065007	Regulación viológica	0.47150
GO:0050794	Regulación de procesos celulares	0.48118
GO:0006915	Apoptosis	0.48644
GO:0012501	Muerte celular programada	0.48644
GO:0044283	Procesos de biosíntesis de moléculas pequeñas	0.48644
GO:0033365	Proteínas de localización de orgánulos	0.48711